

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

Дубовик Євген Іванович

УДК 616.831-005.1-06:616.12-005.4:575.113.2(043.5)

**ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ
ЦИКЛУ ВІТАМІНУ К ДЛЯ РОЗВИТКУ ІШЕМІЧНОГО
АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІНСУЛЬТУ**

Спеціальність 14.03.04 – патологічна фізіологія

**Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук**

**Науковий керівник –
Атаман Олександр Васильович,
професор, доктор медичних наук**

Суми – 2017

ЗМІСТ

	С.
Перелік умовних скорочень	3
Вступ	5
Розділ 1 Огляд літератури.	12
1.1 Роль генетичного поліморфізму у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту.	12
1.2 Структура та функція білків циклу вітаміну К.	20
1.3 Поліморфізм генів циклу вітаміну К та їх зв'язок із розвитком серцево-судинних захворювань.	30
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження	36
2.1 Характеристика клінічного матеріалу.	36
2.2 Молекулярно-генетичні дослідження	40
2.3 Методи статистичного аналізу	43
Розділ 3 Результати власних досліджень	45
3.1 Зв'язок G-1639A-поліморфізму гена <i>VKORC1</i> з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту	45
3.2 Асоціація С1173Т-поліморфізму гена <i>VKORC1</i> з розвитком ішемічного інсульту атеротромботичного генезу.	68
3.3 Вплив Arg406Arg-поліморфізму гена <i>GGCX</i> на розвиток атеротромботичного підтипу інфаркту головного мозку.	89
3.4 Аналіз поєднаного впливу поліморфізмів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту.	110
Розділ 4 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	118
Висновки	136
Список використаних джерел	138

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія.

АТ – артеріальний тиск.

АТ_{діаст} – діастолічний артеріальний тиск.

АТ_{пульс} – пульсовий артеріальний тиск.

АТ_{сист} – систолічний артеріальний тиск.

АТ_{сер} – середній артеріальний тиск.

ГМК – гладкі м'язові клітини.

ЕР – ендоплазматичний ретикулум.

ІАТІ – ішемічний атеротромботичний інсульт.

ІКА – інформаційний критерій Акайке.

ІМТ – індекс маси тіла.

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота.

ХС – холестерол.

ХС-ЛПВГ – холестерол ліпопротеїдів високої густини.

ХС-ЛПДНГ – холестерол ліпопротеїдів дуже низької густини.

ХС-ЛПНГ – холестерол ліпопротеїдів низької густини.

А – аденін.

Arg – аргінін.

С – цитозин.

СІ – довірчий інтервал.

G – гуанін.

GAS6 – білок, що специфічно затримує ріст 6.

GGCX – γ -глутамілкарбоксилаза.

Gla – γ -карбоксивглутамінова кислота.

Gln – глутамін.

Glu – глутамінова кислота.

GRP – Gla-rich-протеїн.

KO – 2,3-епоксид вітаміну K.

KH₂ – вітамін-K-гідрохінон.

LD – нерівноважне зчеплення.

MDR – зменшення багатofакторної розмірності.

MGP – матриксний Gla-протеїн.

OR – відношення шансів.

PCR – полімеразна ланцюгова реакція.

POSTN – періостин.

RFLP – поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів.

SNP – однонуклеотидний поліморфізм.

T – тимін.

VKDPs – вітамін-K-залежні білки.

VKOR – вітамін-K-епоксидредуктаза.

VKORC1 – субодиниця 1 вітамін-K-епоксидредуктазного комплексу.

ВСТУП

Актуальність теми

Ішемічний інсульт належить до найбільш частих і тяжких форм цереброваскулярних захворювань. За результатами широкомасштабних епідеміологічних досліджень, смертність від інфаркту головного мозку становить 12-15 % від показника загальної смертності [94, 99, 206, 258]. В Україні за 1 рік реєструється більше ніж 100 тис. нових випадків ішемічного інсульту, 40 тис. з яких закінчується смертю пацієнта впродовж першого року. Інші вмирають у наступні 3 роки або назавжди залишаються інвалідами [4, 11]. Вражаючим є й той факт, що ця хвороба почала все частіше уражати осіб середнього та молодого віку і на сьогодні є причиною третини випадків інвалідності серед працездатного населення [7, 8, 10].

Найпоширенішим серед інсультів ішемічного генезу є гостре порушення мозкового кровообігу, спричинене церебральним атеросклерозом. Так, за повідомленнями різних авторів, на частку атеротромботичного інсульту припадає від 60 до 75 % усіх випадків ішемічних інсультів [99, 133, 138, 236].

Серед причин ішемічного атеротромботичного інсульту вагомого значення сьогодні надають процесам кальцифікації судинної стінки та порушенням функціонування системи гемостазу [84, 100, 124, 219, 240]. Відомо, що низка білків, які забезпечують функціонування системи коагуляції крові (фактори згортання II, VII, IX, X), антикоагулянтної системи (протеїни C, S, Z) та запобігають ектопічній мінералізації судинної стінки (матриксний Gla-протеїн, Gla-rich-протеїн, остеокальцин), проходить у рамках посттрансляційної модифікації фазу активації у циклі вітаміну K [233, 240]. Завдяки цьому залишки глютамінової кислоти в амінокислотних послідовностях вище наведених протеїнів перетворюються на залишки γ -карбоксихлутамінової кислоти, переводячи таким чином білки з неактивної в активну форму. Функціонування самого циклу вітаміну K неможливе без

вітамін-К-епоксидредуктази (*VKORC1*) та γ -глутамілкарбоксилази (*GGCX*) – ферментів, дія яких спрямована на постійне відновлення окиснених форм вітаміну К та перенесення карбоксильних залишків під час γ -карбоксилювання [162, 199]. Останнє дає можливість припустити, що дефекти функціонування цих ензимів можуть стати відправною точкою у спотвореній реалізації молекулярного каскаду активації вітамін-К-залежних білків, що в кінцевому підсумку стане причиною тромбозів і кальцифікації стінки судин та одного з їх найтяжчих ускладнень – інфаркту головного мозку.

Потужність та успіх сучасної науки багато в чому визначаються складністю й технологічністю методів, які вчений використовує для вирішення поставлених завдань. Новітня методична база медико-біологічної науки дозволяє заглиблюватись у вивчення структури генетичної інформації та молекулярних процесів її реалізації. Секвенування геному людини та відкриття явища однонуклеотидного поліморфізму генів привели до нових можливостей щодо вивчення впливу генетичного коду на кількісні зміни експресії та подальше біологічне функціонування білків, а також спрямували зусилля науковців на пошук зв'язку однонуклеотидних варіацій із розвитком патологічних процесів і хвороб.

Не дивно, що за останнє десятиріччя світова наукова література поповнилася великою кількістю праць, спрямованих на розкриття генетичної складової ішемічного інсульту. Серед них низка робіт, що присвячені пошуку зв'язку поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів деяких факторів згортання крові [105, 188], білків антикоагулянтної системи [183, 187], а також генів *VKORC1* [43, 50] та *GGCX* [113] з розвитком ІАТІ та факторами його ризику. Проте дані, одержані різними вченими, мають популяційні відмінності й не завжди збігаються. В Україні проведене лише одне дослідження з вивчення ролі деяких поліморфізмів генів *VKORC1* та *GGCX* у розвитку ішемічного інсульту [44]. Праці, спрямовані на пошук асоціації G-1639A-, C1173T-поліморфних ділянок гена *VKORC1* та поліморфного

локусу Arg406Arg гена *GGCX* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в нашій країні, відсутні. Останнє й спонукало нас до проведення власних досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертацію виконано відповідно до плану наукових досліджень Сумського державного університету МОН України. Вона є самостійним фрагментом науково-дослідної теми «Зв'язок алельного поліморфізму «генів ектопічної кальцифікації» з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень» (номер державної реєстрації 0115U000688).

Мета дослідження – з'ясування ролі поліморфізму генів циклу вітаміну К у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту у пацієнтів із різними факторами ризику.

Завдання дослідження:

1 Провести визначення частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів G-1639A та C1173T гена *VKORC1* і Arg406Arg гена *GGCX* у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та осіб групи порівняння.

2 Вивчити зв'язок алельного поліморфізму G-1639A гена *VKORC1* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту.

3 Визначити асоціацію поліморфного сайту C1173T гена *VKORC1* з ішемічним інсультом атеротромботичного генезу.

4 Проаналізувати вплив однонуклеотидного поліморфізму Arg406Arg гена *GGCX* на патогенез ІАТІ.

5 Дослідити статеві відмінності у зв'язку поліморфних варіантів G-1639A та C1173T гена *VKORC1* і Arg406Arg гена *GGCX* з інфарктом головного мозку.

6 Провести дослідження асоціації SNP генів *VKORC1* (G-1639A та C1173T) та *GGCX* (Arg406Arg) з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту з урахуванням різних факторів ризику.

7 З'ясувати поєднаний вплив поліморфізмів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного інсульту атеротромботичного генезу.

Об'єкт дослідження – патогенез ішемічного атеротромботичного інсульту.

Предмет дослідження – роль поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів циклу вітаміну К у розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

Методи дослідження – клінічні, молекулярно-генетичні, методи статистичного оброблення та аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів

Уперше серед представників української популяції проведено визначення частот алелів та розподілу генотипів за поліморфними варіантами G-1639A і C1173T гена *VKORC1* та Arg406Arg гена *GGCX*. Виявлено, що існує достовірна різниця у співвідношенні різних алельних варіантів за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* між хворими з ішемічним атеротромботичним інсультом та особами без цього захворювання.

Уперше встановлено зв'язок між поліморфними локусами G-1639A (ген *VKORC1*) і Arg406Arg (ген *GGCX*) та ішемічним атеротромботичним інсультом. Показано, що у носіїв мінорного А-алеля (поліморфізм G-1639A) ризик розвитку інфаркту головного мозку у 2,1 раза вищий, ніж у гомозигот за основним G-алелем, а у гомозигот T/T (поліморфізм Arg406Arg) ймовірність настання ІАТІ в 3,1 раза вища, ніж у носіїв основного С-алеля. Поряд із цим поліморфний сайт C1173T гена *VKORC1* не асоційований із ризиком розвитку цієї хвороби.

З'ясовано, що вплив поліморфних локусів G-1639A гена *VKORC1* та Arg406Arg гена *GGCX* на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту залежить від статі, індексу маси тіла пацієнта, а також наявності чи відсутності у нього таких модифікованих факторів ризику, як артеріальна гіпертензія та звичка паління.

Установлено, що гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C за G-1639A- і C1173T-поліморфізмами гена *VKORC1* підвищують ймовірність розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту, а гаплотип -1639G/1173C

має протективне значення. Також показано, що поєднання в однієї особи артеріальної гіпертензії та наявності мінорного А-алеля в -1639-му положенні промотору гена *VKORC1* є значущим предиктором високого ризику розвитку інфаркту головного мозку.

Практичне значення одержаних результатів

Дисертаційна робота є фундаментальним дослідженням. Одержані у роботі результати та висновки розширюють і поглиблюють наукові уявлення про роль генетичного поліморфізму білків циклу вітаміну К у розвитку атеросклерозу та його ускладнень, зокрема ішемічного атеротромботичного інсульту.

Алелі та генотипи за поліморфними варіантами G-1639A (ген *VKORC1*) і Arg406Arg (ген *GGCX*), для яких був установлений зв'язок з ішемічним атеротромботичним інсультом, можуть бути маркерами для оцінювання індивідуального ризику розвитку цього захворювання в осіб із різними модифікованими та немодифікованими факторами ризику атеросклерозу. Виявлення у пацієнтів генетичної схильності до ішемічного інсульту атеротромботичного генезу дозволить вчасно розпочинати профілактичні заходи та максимально персоніфіковано підходити до лікування в разі розвитку хвороби.

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, впроваджено у науково-дослідну роботу і навчальний процес на кафедрах патофізіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), Івано-Франківського національного медичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Одеського національного медичного університету, Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава), ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», на кафедрі фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету МОН України.

Особистий внесок здобувача

Автором самостійно проведені патентно-інформаційний пошук, огляд та аналіз наукової літератури за темою дисертаційного дослідження, сформульовані мета і завдання роботи, розроблений та обґрунтований план досліджень. Дисертантом особисто виконано молекулярно-генетичні дослідження в науковій лабораторії молекулярно-генетичних досліджень Сумського державного університету МОН України (науковий керівник – проф. О. В. Атаман, завідувач лабораторії – проф. В. Ю. Гарбузова). Здобувачем статистично опрацьовано та проаналізовано одержані результати, написано всі розділи дисертації та сформульовано висновки, а також підготовлено матеріали до публікації.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації повідомлено й обговорено на 8th International Student Medical Congress in Košice, Slovakia (22–24 June 2016); 4th International Scientific Conference of Students and Young Scientists “Topical Issues of Clinical and Theoretical Medicine”, Sumy, Ukraine (21–22 April 2016); 20th International Medical Congress of Students and Young Scientists, Ternopil, Ukraine (25–27 April 2016); International Medical Congress of Silesia 2016, Katowice, Poland (28–29 April 2016); 27th European Students’ Conference “Facing Antimicrobial Resistance – Research Revolution wanted”, Berlin, Germany (September 28 – October 1 2016); VII Національному конгресі патофізіологів України за міжнародні участі: «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», м. Харків (5–7 жовтня 2016 р.); науково-практичній конференції за міжнародної участі «Ендокринна патологія у віковому аспекті», м. Харків (24–25 листопада 2016 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров’я», м. Полтава (25 листопада 2016 р.).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, з яких 6 статей (1 – у зарубіжному виданні, що обліковується наукометричною базою

Scopus, 5 – у фахових виданнях, що входять до переліку ВАК України), 8 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій. Три наукові праці опубліковано за одноосібної участі автора.

Обсяг і структура дисертації

Дисертацію викладено на 167 сторінках (основний обсяг становить 137 сторінок). Вона складається із вступу, чотирьох розділів: огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, а також висновків і списку використаних джерел. Останній містить 260 найменувань (11 – кирилицею, 249 – латиницею). Роботу ілюстровано 63 таблицями та 25 рисунками.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль генетичного поліморфізму у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту

Ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) – це мультифакторіальна патологія, розвиток якої обумовлений складною взаємодією генетичних чинників та факторів зовнішнього середовища [77, 82, 118, 129, 141, 182]. Складний ланцюг подій, що визначають патогенез цього захворювання, може бути умовно поділений на два періоди. Перший – це розвиток атеросклеротичного ураження судин головного мозку та тромботичних ускладнень у ділянці ерозованої бляшки. Другий період характеризується комплексом реакцій тканин головного мозку у відповідь на припинення або значне послаблення надходження до них артеріальної крові [72, 81, 202]. Таким чином, перший період, відображаючи конкретний механізм розвитку ішемії, є специфічним для атеротромботичного патогенетичного підтипу інфаркту головного мозку, тоді як другий є загальним для всіх ішемічних інсультів.

На сьогодні відома значна кількість білків, яким належить важлива роль у тих чи інших ланках патогенезу атеротромбозу [17, 66, 76, 157, 168, 169, 186, 200, 201, 205, 232]. Структура та функції вказаних протеїнів значною мірою зумовлюються нуклеотидною послідовністю їх генів, точкові зміни в яких можуть вагомо впливати на якісні та кількісні характеристики зрілих білків. Серед основних причин таких змін особливу увагу сьогодні приділяють явищу однонуклеотидного поліморфізму (SNP). За останні десятиріччя проведено низку досліджень, спрямованих на пошук зв'язку поліморфних варіантів різних генів із розвитком атеросклерозу та його фатальних ускладнень [77, 82, 107, 111, 129]. Такі роботи, з одного боку, дозволяють виявляти маркери для ймовірного прогнозування ризику

настання інфаркту головного мозку в конкретної особи, а з іншого – є одним з експериментальних методів перевірки гіпотез про причетність окремих білків до патогенезу ІАТІ.

Нижче наведені дані результатів праць щодо асоціації поліморфних сайтів генів, задіяних у патогенезі атеросклерозу, з ішемічним атеротромботичним інсультом у різних популяціях.

Гени, що впливають на ліпідний обмін. Аполіпопротеїн Е (apo E) – це ліганд для багатьох рецепторів клітинної мембрани, функції якого полягають у забезпеченні метаболізму атерогенних ліпопротеїнових частинок та надходженні у клітину специфічних ліпопротеїнів. Було продемонстровано, що поліморфізм $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена *APOE* впливає на концентрацію загального холестеролу та ЛПНГ плазми крові. Так, у хворих на ішемічний інсульт з $\epsilon 4$ -варіантом SNP вміст наведених сполук був вищим, ніж у пацієнтів з $\epsilon 2$ - та $\epsilon 3$ -різними видами поліморфного локусу гена *APOE* [45]. Нещодавній метааналіз робіт щодо асоціації поліморфних варіантів гена аполіпопротеїну Е з розвитком різних підтипів інсульту серед населення Китаю засвідчив, що носійство $\epsilon 4$ -варіанта в 2,2 рази підвищує ризик настання інфаркту головного мозку порівняно з алелями $\epsilon 2$ і $\epsilon 3$ [65]. Подібні результати були характерними і для Якутської етнічної групи [176], де частота $\epsilon 4$ -алеля була значущо вищою серед пацієнтів з ІАТІ порівняно з контрольними особами. Крім того, існують повідомлення про те, що $\epsilon 4$ -алель гена *APOE* може бути генетичним маркером для прогнозування атеротромботичного і лакунарного інсультів [41, 46], а також формування атеросклеротичної бляшки [161]. Водночас показана протективна роль алеля $\epsilon 2$ стосовно атеросклеротичного ураження сонних артерій [161]. Натомість серед популяції Греції не виявлено зв'язку між $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ -поліморфізмом гена *APOE* та різними підтипами ішемічного інсульту [40].

Як відомо, білки родини параоксоназ (PON) відіграють важливу роль у захисті від перекисного окиснення ліпідів, чим значною мірою запобігають розвитку атероматозу [145, 173]. Групою Kim et al. показано, що зменшення

активності цих протеїнів унаслідок генетичного поліморфізму може спричиняти формування атеросклеротичної бляшки та призводити таким чином до інфаркту головного мозку [78]. Одним із найбільш вивчених однонуклеотидних поліморфних сайтів гена параоксонази 1 (*PON1*), що визначає активність цього ферменту, є Q192R [196]. У кількох дослідженнях був виявлений зв'язок мінорного алеля за зазначеним SNP зі зростанням ризику ішемічного атеротромботичного інсульту [171, 229] та стовщенням судинної стінки [208].

LOX-1 (lectin-type oxidized LDL receptor 1) – один з основних “scavenger” рецепторів для окиснених ліпопротеїнів низької густини, структура якого кодується геном *OLR1* (Oxidized low-density lipoprotein receptor 1). Функція цього протеїну полягає у пізнаванні, інтерналізації та деградації окиснених ЛПНГ, роль яких у розвитку атеросклерозу пов'язана із впливом на ендотеліальні клітини та активацією в них прозапальної відповіді, оксидативного стресу, некрозу та апоптозу [220]. Таким чином, є підстави припускати, що LOX-1 може сприяти регресуванню атеросклеротичного ураження шляхом зв'язування, ендоцитозу та руйнації окиснених ЛПНГ [203]. Дослідження, проведені Vietri et al. серед населення Італії, показали, що гомозиготи за мінорним алелем за поліморфними сайтами IVS4-14 A/G і IVS4-73 C/T гена *OLR1* мали більш високий ризик розвитку ішемічного інсульту, і серед них достовірно частіше спостерігались особи з тяжким перебігом цього захворювання [135]. Метааналіз, виконаний Au et al., довів зв'язок мінорного С-алеля за поліморфізмом rs11053646 G > C гена *OLR1* з підвищеним ризиком розвитку інфаркту головного мозку [228].

Гени, що впливають на артеріальний тиск. Ангіотензин-конвертуючий ензим (ACE) є важливою складовою частиною ренін-ангіотензинової системи, а порушення його функції відіграє значну роль у розвитку артеріальної гіпертензії та атеросклерозу [32, 34, 197]. Кілька досліджень типу «випадок-контроль» продемонстрували вплив гомозиготного генотипу D/D за поліморфізмом інсерція (I)/делеція (D) шістнадцятого інтрона гена

ACE на розвиток ішемічного інсульту [24, 33]. Вченими було зроблено припущення, що такий ефект опосередкований есенціальною гіпертензією. Натомість у роботі Möllsten et al. зв'язок D-алеля за зазначеним поліморфним сайтом із розвитком інсульту ішемічного генезу був виявлений серед нормотензивних пацієнтів [156]. Два нещодавніх метааналізи, виконані Zintzaras et al. [35] та Zhang et al. [36], підтвердили причетність поліморфізму I/D гена *ACE* до підвищеного ризику розвитку ішемічної хвороби серця та інфаркту головного мозку.

Ще одним важливим компонентом ренін-ангіотензинової системи є ангіотензиноген (*AGT*). У дослідженні Rijn et al. показаний зв'язок T-алеля за M235T-поліморфним сайтом (заміна метіоніну на треонін у 235-й позиції білка) гена *AGT* із підвищеним артеріальним тиском, розвитком атеросклерозу та його ускладнень [180]. А метааналізи 2013 та 2015 рр. довели достовірний зв'язок T/T-генотипу за названим поліморфізмом із підвищеним ризиком розвитку різних підтипів ішемічного інсульту [37, 38].

Гени ендотеліальної дисфункції. Гіпергомоцистеїнемія є незалежним фактором ризику ішемічного інсульту [42]. Надмірна кількість гомоцистеїну чинить токсичний ефект на ендотеліальні клітини, посилюючи в них процеси перекисного окиснення ліпідів та інгібуючи синтез оксиду азоту. Одним із ключових ферментів, задіяних у метаболізмі гомоцистеїну, є метилентетрагідрофолатредуктаза (*MTHFR*). Одним із найбільш вивчених одонуклеотидних поліморфізмів гена *MTHFR* є C667T. Наявність T-алеля призводить до посилення термолабільності білка та зменшення його ферментативної активності [136]. Зв'язок T/T-генотипу за зазначеним SNP із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту був установлений під час численних досліджень у багатьох популяціях [52, 127, 154, 221], включаючи українську [1]. Узагальнювальний висновок, зроблений колективом Kumar et al. після метааналізу, також підтверджує асоціацію C667T-поліморфного сайту гена *MTHFR* із ризиком розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту [47].

Оксид азоту (NO) є важливим регуляторним чинником у цереброваскулярній системі, що сприяє розширенню судин і пригнічує адгезію та агрегацію тромбоцитів [215]. Вважається, що серед трьох ізоформ NO-синтази (ендотеліальна (eNOS), нейрональна (nNOS) та індукована цитокінами (iNOS)), ферменту, що причетний до синтезу NO, найбільш вагома роль у підтриманні мозкового кровообігу належить саме ендотеліальній ізоформі [73]. Серед багатьох поліморфізмів гена *eNOS* вагомого значення у розвитку цереброваскулярних захворювань надають поліморфним сайтам 4b/a, T-786C і G894T. У дослідженнях Majumdar et al. було показано, що 4a-алель за 4b/a SNP більше ніж у два рази підвищує ризик розвитку ішемічного інсульту серед жіночого населення Східної Індії [48]. У роботі Zhang et al. встановлений зв'язок мінорного T-алеля за поліморфізмом G894T гена *eNOS* із ризиком розвитку інфаркту головного мозку серед населення Китаю [223]. Асоціація T-786C з ризиком розвитку ІАГІ була виявлена у дослідженні Meng et al. [49]. Показано, що носійство мінорного C-алеля збільшує ймовірність настання ішемічного інсульту, натомість T-алель має протективне значення. Дослідження, проведені в українській популяції, продемонстрували, що серед трьох вище зазначених SNP лише поліморфний сайт T-786C пов'язаний із розвитком гострого коронарного синдрому [28]. І, нарешті, метааналіз, що охоплював 28 різних досліджень щодо зв'язку поліморфних варіантів гена ендотеліальної NO-синтази з розвитком ішемічного інсульту, дозволив зробити висновок, що поліморфізми 4b/a, T-786C, G894T достовірно асоційовані з ризиком настання інфаркту головного мозку [92].

Ендотелін-1 (ET-1) є сильнодіючим судинозвужувальним пептидом, що синтезується переважно ендотеліальними клітинами судин. Вважається, що йому належить значна роль у розвитку атеросклерозу через можливий вплив на ендотеліальну дисфункцію та проліферацію гладких м'язових клітин судин [54]. Одним із найбільш вивчених поліморфних сайтів гена ендотеліну-1 (*EDN1*) з огляду на зв'язок із серцево-судинними

захворюваннями є Lys198Asn [25]. Результати досліджень групи Zhang et al. продемонстрували достовірну асоціацію цього SNP із розвитком ішемічного інсульту в китайській популяції [260]. Було показано, що наявність мінорного T-алеля призводить до двократного зростання ризику настання інфаркту головного мозку. Подібні результати були одержані і під час дослідження Lys198Asn-поліморфізму гена *EDN1* серед населення України [9]. Так, у гомозигот за мінорним алелем ризик розвитку ІАТІ в 4 рази вищий, ніж у гомозигот за основним алелем.

Гени, що впливають на ремоделювання судин. Судинне ремоделювання відіграє важливу роль у розвитку атеросклеротичних змін артеріальної стінки [140]. Матриксні металопротеїнази (ММР) завдяки своїм протеолітичним властивостям здатні регулювати накопичення екстрацелюлярного матриксу під час уражень тканин і тому можуть бути причетні до здійснення контролю над ростом атеросклеротичної бляшки [97]. Доказом цього є результати кількох досліджень, що показали значне підвищення рівня експресії *MMP-3* та *MMP-9* у місцях утворення атероми та скупчення «пінистих» клітин [58, 83]. Kaplan et al. було показано, що 6A-алель за 5A/6A-поліморфним варіантом промотору гена *MMP-3* причетний до розвитку атеросклерозу. Дослідники пояснили, що наявність цього алеля призводить до зменшення кількості мРНК *MMP-3*, що врешті-решт виявляє себе низькою протеолітичною активністю та сприяє накопиченню компонентів позаклітинного матриксу в ділянці атеросклеротичної бляшки, обумовлюючи таким чином її швидкий ріст [149]. Поряд із цим результати дослідження Sherva et al. довели, що в пацієнтів із 6A/6A-генотипом ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту є значущо вищим, якщо порівнювати з гомозиготами 5A/5A [174]. У праці Buraczynska et al. досліджувався вплив C-1562T-поліморфного варіанта гена *MMP-9* на розвиток ішемічного інсульту серед населення Польщі [150]. Результати показали, що мінорний T-алель призводить до підвищення ризику розвитку цієї недуги. Крім того, у гомозигот за мінорним алелем інсульт виникає в

більш ранньому віці, якщо порівнювати з гомозиготами за основним С-алелем. Проте у роботі Szczudlik et al. не було виявлено асоціації між поліморфізмом С-1562Т гена *MMP-9* та розвитком різних підтипів інсульту в цій самій популяції [217].

Вітамін К-залежні білки. Серед гетерогенної групи вітамін К-залежних білків є низка таких, що безпосередньо задіяні у процесах гемостазу. Звісна річ, що гени цих білків є кандидатами на роль чинників тромботичних ускладнень, зокрема і під час розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту. Одним із таких є ген протромбіну (*F2*). Заміна гуаніну на аденін у 20210-му положенні гена *F2* (поліморфний локус G20210A) призводить до підвищеної активності білка, а отже, збільшує ймовірність тромбоутворення [57]. Результати досліджень продемонстрували зростання ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту в носіїв мінорного А-алеля порівняно із носіями G/G-генотипу [105, 188].

Інший вітамін К-залежний білок – протеїн Z – є кофактором для Z-залежного інгібітору протеази, що деактивує фактор X згортання крові. Вважається, що підвищена концентрація протеїну Z може призвести до надмірного пригнічення коагуляційного гемостазу, а отже, і до кровотеч, тоді як зменшена кількість цього білка може бути причиною тромботичних ускладнень [239]. У праці Staton et al. показано, що А-13G- та G79А-поліморфні варіанти гена протеїну Z (*PROZ*) впливають на концентрацію цього білка в плазмі крові та причетні до розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту [187]. Так, у носіїв мінорних алелів за зазначеними SNP вміст протеїну в крові Z був значущо меншим, а ризик ІАТІ – відповідно вищим, ніж у гомозигот за основним алелем.

Матриксний Gla-протеїн (*MGP*) – один із основних вітамін К-залежних білків, що задіяний у процесах кальцієвого обміну та є потужним інгібітором мінералізації судин. З огляду на це на сьогодні існує низка робіт, присвячених вивченню ролі генетичного поліморфізму *MGP* із розвитком атеросклерозу та його ускладнень [70, 148, 163, 222]. Щодо ішемічного

атеротромботичного інсульту, то зв'язок поліморфних сайтів гена *MGP* з цією недугою виявлений лише в українській популяції. Так, Harbuzova et al. показали, що у гомозигот А/А за G-7A-поліморфним сайтом промотору гена матричного Gla-протеїну ризик розвитку ІАТІ удвічі вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (G/G-генотип) [230].

Ген *growth arrest-specific 6 (GAS6)* кодує структуру вітамін-К-залежного білка, що специфічно затримує ріст б, який являє собою ліганд до тирозинкіназних рецепторів. Функціонування *GAS6* протеїну має відношення до регуляції запалення, ангиогенезу, процесів гемостазу та розвитку атеросклерозу [96]. Доведено, що рівень експресії *GAS6* корелює зі стабільністю бляшки та ризиком інфаркту міокарда [132, 175]. Дослідження Muñoz et al. продемонстрували, що мінорний А-алель за поліморфним сайтом с.834 + 7G>А гена *GAS6* пов'язаний зі зменшеним ризиком розвитку ішемічного інсульту, якщо порівнювати з гомозиготами за основним алелем [55].

Таким чином, поліморфні варіанти наведених та багатьох інших генів, впливаючи на кінцеві біологічні ефекти своїх протеїнів, мають беззаперечне значення у розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту. Поряд із цим неоднозначна роль вітамін-К-залежних білків у різних механізмах реалізації клітинно-молекулярного каскаду атеросклеротичного процесу та його ускладнень, зокрема ектопічній кальцифікації, розладах коагуляційного та тромбоцитарного гемостазу, проліферації гладенько-м'язових клітин судин, обумовила особливу увагу світових учених до поліморфізму їх генів. Ураховуючи те, що функціонування вітамін-К-залежних протеїнів вимагає попередньої активації у циклі вітаміну К у вигляді карбоксилування глутамінових залишків, за останні кілька років дослідницький фокус змістився на вивчення поліморфних варіантів генів γ -глутамілкарбоксилази та вітамін-К-епоксидредуктази, білки яких і забезпечують цю посттрансляційну модифікацію.

1.2 Структура та функція білків циклу вітаміну К

Основною функцією вітаміну К у ссавців є дія як кофактора для ферменту γ -глутамілкарбоксилази (GGCX). Остання каталізує реакцію карбоксилювання специфічних залишків глутамінової кислоти (Glu) в пептидних послідовностях вітамін-К-залежних білків (vitamin K-dependent proteins (VKDPs)), що призводить до утворення γ -карбоксиглутамату (Gla) [199]. Враховуючи те, що залишки Glu є значно слабшими хелаторами іонів кальцію, ніж залишки Gla, така посттрансляційна модифікація має вирішальне значення для біологічної активації VKDPs, до яких на сьогодні відносять ряд факторів згортання крові (фактори II, VII, IX, X); білки антикоагулянтної системи (протеїни S, C і Z); білки, причетні до мінералізації кісток та м'язих тканин (матриксний Gla-протеїн (MGP), Gla-rich-протеїн (GRP), остеокальцин) [114, 240]; білки, що беруть участь у реакціях формування тромбоцитарного тромбу та проліферації гладком'язових клітин судин (growth arrest-specific 6 (GAS6)) [117], процесах запалення і ремоделюванні сполучної тканини (періостин (POSTN)) [119]; два трансмембранні Gla-протеїни (TMG3 і TMG4) і два збагачені проліном Gla-протеїни (PRGP1 і PRGP2), функція яких наразі є невідомою [233].

У процесі карбоксилювання гамма-протон глутамінової кислоти відводиться оксигенованим посередником вітаміну К із подальшим додаванням вуглецю за допомогою GGСХ [199]. Одночасно з карбоксилюванням відновлена форма вітаміну К (вітамін-К-гідрохінон (KH₂)) окиснюється до 2,3-епоксид вітаміну К (КО), який через обмежену кількість вітаміну К *in vivo* для продовження реакції повинен бути знову перетворений на KH₂. Фермент, що каталізує таку реакцію, називається вітамін-К-епоксидредуктаза (VKORC1) [162].

Таким чином, циклічний процес утворення епоксиду вітаміну К та його зворотне відновлення до гідрохінону вітаміну К під час активації вітамін-К-залежних білків складає окисно-відновний цикл, відомий сьогодні

як цикл вітаміну К [13, 104, 233]. При цьому ферментами, що реалізують функціонування цієї біохімічної системи є γ -глутамілкарбоксилаза та вітамін-К-епоксидредуктаза (рис. 1.1).

Вітамін-К-залежна γ -глутамілкарбоксилаза побудована із 758 амінокислотних залишків (молекулярна маса 94 кДа) та являє собою інтегральний трансмембранний фермент, що каталізує реакцію оксигенації вітаміну К та карбоксилювання глутамінових залишків вітамін-К-залежних білків.

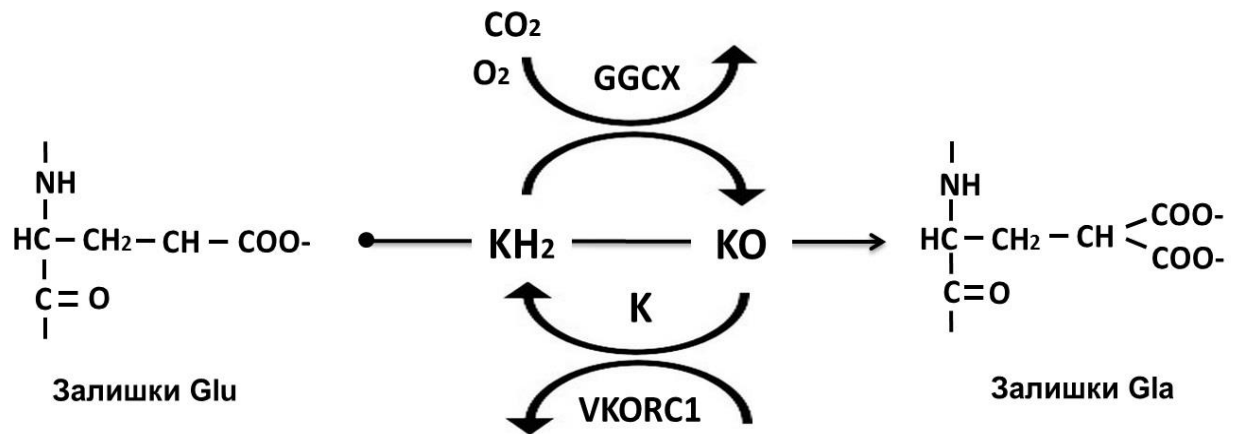


Рисунок 1.1.1 – Схематичне зображення циклу вітаміну К. GGСХ – γ -глутамілкарбоксилаза; VKORC1 – вітамін-К-епоксидредуктаза

Перше повідомлення про ферментативну активність GGСХ у супернатантах гепатоцитів було зроблено Shah et al. у 1974 році [207]. З того часу низка дослідницьких груп намагалася виділити цей інтегральний мембранний протеїн, використовуючи сольову преципітацію, імуноадсорбцію та афінну хроматографію [172, 245]. Hubbard et al., знаючи, що GGСХ взаємодіє із попередниками факторів згортання крові за допомогою пропептиду із 18 амінокислотних залишків, змогли виділити ензим із печінкових мікросом [245]. Дослідники виявили, що карбоксилазна активність очищеної GGСХ була у 10 000 разів вищою, ніж у неочищених мікросомах. Проте питома активність ферменту, який вони виділили,

неістотно відрізнялася від такої у раніше частково пурифікованої GGCX. Значно пізніше було встановлено, що пептид, який складається із 59 амінокислотних залишків і містить пропептид та Gla-домен дев'ятого фактора згортання крові, є чудовим афінним лігандом для очищення GGCX [259]. Використовуючи його, Wu et al. реалізували понад 90 % очищення GGCX із бичачих гепатоцитів.

Після виділення бичачої GGCX на основі її амінокислотної послідовності був створений нуклеотидний фрагмент із метою пошуку відповідного гена в бібліотеці ДНК печінки биків. Останнє дозволило ідентифікувати ген *GGCX* і в бібліотеці ДНК печінки людини [68]. Після цього був зроблений значний прогрес у розумінні механізмів дії цього ферменту та його взаємодії із субстратами [213]. GGCX розпізнає вітамін-К-залежні білки шляхом щільного зв'язування з їх пропептидами [170]. Під час процесу карбоксилювання до С-гідрогену глутаматного залишку протеїну додається CO_2 [246]. Одночасно із цим GGCX окиснює вітамін K_{10} до вітамін- K_{11} з метою одержання необхідної для каталізу реакції енергії [142]. Таким чином, до функціональних ділянок і критичних залишків у GGCX належать сайт зв'язування пропептиду, сайт зв'язування глутамату, сайт зв'язування вітаміну К, активний сайт карбоксилювання, активний сайт утворення епоксиду і, можливо, сайт зв'язування CO_2 .

Приєднання пропептиду до GGCX ініціює структурну реорієнтацію ензиму, в результаті цього Gla-домен субстрату розміщується в ділянці каталітичного сайту [14, 87]. Через інтегральне мембранне розташування GGCX ідентифікація її функціональних регіонів була доволі складною. Використовуючи афінне маркування та мутагенезний аналіз, було встановлено, що сайт зв'язування пропептиду та активний сайт карбоксилювання розміщується в межах N-кінцевої ділянки ферменту між 1-м та 225-м амінокислотними залишками [184]. Проте результати обмеженого трипсинового протеолізу показали, що сайт зв'язування пропептиду розміщений між 495-м та 513-м залишками С-кінцевого регіону

білка [231]. Дослідження природної мутації W501S гена *GGCX* продемонструвало, що основним наслідком такої зміни гена ферменту є зменшення спорідненості зрілого білка до пропептидів субстратів [63]. Нещодавно гідроген/дейтерій-обмінна мас-спектрометрія була використана для характеристики специфічних регіонів *GGCX*, що реалізують структурну перебудову ферменту після приєднання пропептидів [14]. Результати показали, що за названу функцію відповідає частина білка в межах між 491-м і 507-м амінокислотними залишками. Таким чином, вищенаведені результати свідчать про те, що сайт зв'язування пропептиду розміщений у С-кінцевій ділянці *GGCX*.

Можливість ідентифікувати сайт зв'язування глутамату з'явилася після вивчення натуральної мутації L394R у гені *GGCX*. Пацієнти, що були гомозиготами за R-алелем, мали виражені розлади згортання крові унаслідок зменшення біологічної активності коагуляційних факторів [18]. Було встановлено, що мутація в ділянці L394, а також мутації у сусідніх залишках (Y395 та W399) призводять до погіршення приєднання глутамату до *GGCX*, що значно зменшує ефективність карбоксилування [15]. Більше того, дослідження з використанням гідроген/дейтерій-обмінної мас-спектрометрії дало можливість чітко встановити, що розпізнавання глутамату є специфічною функцією консервативного регіону між 393-м та 404-м залишками ферменту [14].

Ідентифікація каталітичних залишків для реакцій карбоксилування та епоксидування була менш успішною. Було повідомлено, що вільні залишки цистеїну в молекулі *GGCX* є важливими для проведення обох зазначених реакцій [62]. Базуючись на цьому, дослідницька група Pudota et al. припустила, що до складу активного центру *GGCX* входять два вільні цистеїнові залишки C99 та C450 [131]. Один із них є слабкою основою для депротонування вітамін-К-гідрохінону, утворюючи після цього сильну основу для від'єднання С-гідрогену від глутамату, а інший цистеїн формує зв'язувальний сайт для CO₂. Проте результати мутагенезного аналізу та

хімічної модифікації дали можливість установити, що залишки цистеїну не причетні до ферментативної активності GGCX. Більше того, було виявлено, що залишки C99 та C450 служать лише для формування дисульфідного містка, який потрібен для структурної стабільності білка [64].

Пізніше Rishavy et al. [19] запропонували активовані аміни як каталітичний сайт для депротонування вітаміну KH_2 . А результати квантового хімічного аналізу наштотували на думку про те, що швидше за все алкоксид вітаміну K є тією сильною основою, яка необхідна для відведення протону від глутамату [191, 192]. Пошук кандидатів основних залишків був проведений із використанням лептоспірозного гомолога та ссавцевого ортолога GGCX [61]. Три консервативні гістидинові та один консервативний лізиновий залишки були виявлені в молекулі ензиму. Заміна зазначених амінокислот на аланін показала, що лише мутація K218A призводила до повної інактивації як реакції карбоксилювання, так і епоксидування. Спираючись на такі результати, автори зробили висновок, що два залишки лізину в положенні 217 та 218 відіграють роль каталітичного сайту GGCX, що ініціює реакцію карбоксилювання.

Із метою встановлення мембранної топології GGCX Tie et al. [22] використали трансляцію/контранслокацію для відображення топологічної орієнтації передбачених трансмембранних доменів в амінокислотній послідовності білка. Крім того, дослідники встановили розміщення N- та C-кінців молекули GGCX шляхом експресії мічених білків у клітинах HEK293. Було показано, що GGCX пронизує мембрану ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) п'ять разів. При цьому амінокінець розташовується в цитоплазмі, а карбоксильний кінець – у просвіті ендоплазматичного ретикулума. Відповідно до цієї топологічної моделі сайт розпізнавання пропептиду, сайт зв'язування глутамату та активний сайт депротонування вітаміну K розміщені у просвіті ЕПР, де й відбувається реакція вітамін-К-залежного карбоксилювання. При цьому амінокислотні залишки, що відповідають за зв'язування вітамін-К-залежних білків, як показали

результати нещодавнього дослідження Tie et al., розміщені у цитоплазматичній частині ферменту [64].

Як уже відзначалося, процес карбоксилювання глутаматних залишків вітамін-К-залежних білків поєднаний з окисненням вітаміну KH_2 до його епоксиду. При цьому завдяки функціонуванню вітамін-К-епоксидредуктази забезпечується постійне відновлення КО з подальшим утворенням вітамін-К-гідроксінону.

Перша праця про часткове очищення молекули VKOR із мікросом гепатоцитів щурів була опублікована групою дослідників Lee et al. у 1985 році [143]. Печінкові мікросоми, розчинені в холаті натрію, були розділені розривним сахарозним градієнтом до ізолятів 200S мікросомальних субфракцій, що містили вітамін-К-епоксидредуктазну активність. У зазначеній 200S-фракції дослідниками був ідентифікований поліпептид із масою 14–17 кДа, що мав утричі вищу специфічну активність для перетворення КО на вітамін К і вітаміну К на KH_2 , ніж початкова мікросома. Проте остаточний висновок авторів свідчив про малу ймовірність того, що поодинокий білок із відносно низькою молекулярною масою здатен каталізувати комплекс складних реакцій. З того часу було прийнято вважати, що VKOR – це мультиферментний комплекс.

Подальші дослідження були зосереджені на пошуку потенційного компонента, що може бути залучений до системи відновлення епоксиду вітаміну К. Навіть після ідентифікації гена VKOR у 2004 році [130, 158] вчені дослідницької групи Rost et al. назвали фермент та його ген субодиноцею 1 вітамін-К-епоксидредуктазного комплексу (VKORC1), припускаючи, що є ще й інша, поки що не ідентифікована, субодиноця.

За останнє десятиріччя до основних кандидатів на місце другого учасника вітамін-К-епоксидредуктазного комплексу належали мікросомальна епоксидгідролаза, НАД(Ф)Н-хінон-оксидоредуктаза 1 (NQO1) та подібний до вітамін-К-епоксидредуктази білок 1 (VKORCL1). Проте результати останніх праць засвідчили, що миші, нокаутовані за геном мікросомальної

епоксидгідролази, не мають дефекту в метаболізмі вітаміну К [211]. Останнє свідчить про те, що мікросомальна епоксидгідролаза не бере участі у відновленні КО. Поряд із цим Caspers et al., проаналізувавши кількість мРНК *VKORC1*, *VKORCL1*, *GGCX*, *NQO1* у 29 різних тканинах щурів, виявили високий рівень експресії *VKORC1* та *GGCX* у печінці, легенях та екзокринних залозах [237]. Натомість *VKORCL1* здебільшого експресувався у тканинах головного мозку, а *NQO1* – у шлунку. Такі результати говорять про те, що функціонування циклу вітаміну К, необхідне для модифікації вітамін-К-залежних білків, відбувається за участю лише *GGCX* та *VKORC1*. На додаток до цього, результати останніх досліджень групи Rishavy et al. показали, що рекомбінантна *VKORC1* здатна самотійно каталізувати обидві реакції відновлення вітаміну К від епоксиду до гідрохінону [234]. Однак остаточний висновок щодо самотійності *VKORC1* у відновленні КО до KH_2 зроблений не був, оскільки не виключається можливість того, що *in vivo* до цього часу невідомий фізіологічний відновник може зв'язуватися з нею, утворюючи мультиензимний комплекс. Із цієї причини у сучасній літературі для позначення ферменту, що каталізує відновлення КО, здебільшого використовують назву *VKORC1* (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1).

На сьогодні відомо, що вітамін-К-епоксидредуктаза (молекулярна маса 18235 Да) складається зі 163 амінокислотних залишків і являє собою інтегральний трансмембранний протеїн, що каталізує відновлення 2,3-епоксиду вітаміну К (КО) до вітаміну К і вітаміну К – до вітамін-К-гідрохінону (KH_2). Аналіз амінокислотної послідовності *VKORC1* представників різних видів тварин виявив наявність чотирьох абсолютно консервативних залишків цистеїну у положеннях 43, 51, 132 та 135 зрілого білка [116]. Було запропоновано, що мотив C132XXC135 утворює активний каталітичний сайт ферменту та реалізує нуклеофільну атаку епоксиду вітаміну К. Використання мутагенезного аналізу дало можливість підтвердити це припущення. Результати продемонстрували, що відсутність

цистеїну у зазначених позиціях амінокислотної послідовності *VKORC1* призводить до інактивації ферменту [93, 137].

Поряд із цим роль С43- та С51-консервативних залишків до сьогодні залишається невідомою. Спираючись на дослідження бактеріального гомолога *VKORC1*, було запропоновано, що цистеїнова петля, утворена наведеними залишками цистеїну, в молекулі людської вітамін-К-епоксидредуктази задіяна у транспорті електронів до каталітичного сайту [137]. Проте пізніше у двох дослідженнях було з'ясовано, що заміна цистеїну в 45-й та 51-й позиціях на серин жодним чином не впливає на активність ферменту [122, 216, 244]. Із метою перевірки результатів цих робіт Tie et al. вводили *VKORC1*, в якому цистеїн у положеннях 43 та 51 був змінений на аланін, у клітини, в яких попередньо був реалізований нокаут генів *VKORC1* та *VKORL1* [95]. Було встановлено, що таким чином мутований білок зберігав близько 90 % ферментативної активності порівняно із контрольними клітинами, які містили незмінену *VKORC1*. Більше того, повне видалення ділянки протеїну, що містить залишки С43 та С51, також істотно не впливало на каталітичну активність ензиму. Останнє дозволило зробити висновок про те, що наведена цистеїнова петля не причетна до ензиматичної активності ферменту.

Необхідно зазначити, що вагомий інтерес сучасної медико-біологічної науки до молекули *VKORC1* серед іншого обумовлений ще й тим, що зазначений білок є точкою прикладання дії цілого ряду оральних антикоагулянтів із групи похідних кумарину, включаючи варфарин. Останній, інгібуючи цей ензим, призводить до зменшення активності факторів згортання крові, зумовлюючи тим самим свій антикоагулянтний ефект.

Результати дослідження натуральної мутації Y139F гена *VKORC1*, що призводить до резистентності до дії варфарину в щурів та людей, дали можливість припустити, що залишок тирозину у 139-му положенні разом із сусіднім залишком утворюють специфічний сайт зв'язування цього

фармакологічного агента [242]. Відсутність чутливості до варфарину в осіб із мутацією Y139F пояснюється відсутністю гідроксильної групи в молекулі фенілаланіну, яка натомість є складовою структури тирозину та відіграє важливу роль у взаємодії із кумариновими похідними [210]. Водночас групою Matagrín et al. було виявлено, що мутація в 139-му положенні гена *VKORC1* призводить до утворення 3-гідроксिवітаміну К. Цей факт свідчить про те, що гідроксильна група у 139-му положенні також задіяна в каталітичній активності ферменту [162]. Загалом наведені результати продемонстрували, що T138-139Y-A140- та C132XXC135-мотиви разом утворюють «карман» для зв'язування як із субстратом (епоксидом вітаміну К), так і з інгібітором (варфарином), що підтверджує припущення про те, що кумаринові похідні та епоксид вітаміну К взаємодіють з одним сайтом у молекулі *VKORC1*.

Поряд із цим згідно із сучасними знаннями до функціональних ділянок молекули *VKORC1* окрім каталітичного центру, що утворений послідовністю Cys132-I-V-Cys135, та сайта зв'язування варфарину, представленого ділянкою 138T-139Y-140A, належить також С-кінцева ділянка утримання сигналу (а C-terminal endoplasmic membrane retention signal (Lys-Lys-X-X або Lys-X-Lys-X-X)) [102]. Остання потрібна для утримання білка в межах ЕПР і є характерною для низки інтегральних протеїнів.

Мембранна топологія *VKORC1* є одним із найбільш дискусійних питань, що постали перед дослідниками структури та функції цього ензиму. Базуючись на результатах біохімічних методів аналізу [235] та кристалічній структурі бактеріального гомолога *VKORH* [216], були запропоновані три- та чотиритрансмембранні топології *VKORC1*. Так, згідно з моделлю, що описує наявність трьох трансмембранних доменів (ТМД) у молекулі цього ферменту, N-кінець розміщений у цитоплазмі, а С-кінець відповідно – у просвіті ЕПР. На противагу цьому чотиридоменна модель вказує на цитоплазматичне розміщення карбоксильного кінця, тоді як амінокінець розташований у просвіті ЕПР [123].

Відповідно до тридоменної моделі активний СХХС-сайт *VKORC1* розміщений у межах останнього ТМД близько до просвіту ЕІР. Гідрофобне оточення СХХС відновного центру узгоджується і з гідрофобними властивостями вітаміну К. Крім того, було показано, що чотири із шести триптофанових залишки в молекулі *VKORC1* розміщені в межах біліпідної мембрани, що ймовірніше за все сприяє утриманню білка у вигляді трьох трансмембранних доменів, оскільки для триптофанових залишків характерним є розташування на межі розподілу фаз для фіксації трансмембранних петель до подвійного ліпідного шару [134].

Ще одним доказом на підтримку тридоменної топології молекули *VKORC1* стали результати молекулярної динамічної симуляції зазначеного ферменту у пальмітоїл-олеїл-фосфатидилетаноламідному ліпідному бішарі [153]. Було встановлено, що наявність трьох ТМД проявляється більшою стабільністю молекули протеїну, ніж наявність чотирьох ТМД, оскільки гідрофобна взаємодія між лейциновими залишками в різних трансмембранних спіралях наявна лише у тридоменному варіанті білка.

Окрім варфарину, за останніми даними, в клітинах організму існує ендогенний інгібітор вітамін-К-епоксидоредуктазного комплексу, названий кальоменіном [253]. Цей білок з'єднується з *VKORC1* та інгібує її активність, а отже, спричиняє менш ефективну роботу вітамін-К-залежного γ -карбоксилювання [224]. Водночас останніми роками до ендогенних регуляторів *VKORC1* долучилася *miR-133a*. Згідно з результатами останніх досліджень, наведена мікроРНК значно знижує експресію *VKORC1* та має відношення до дозування оральних антикоагулянтів [74, 155].

Таким чином, білки циклу вітаміну К, забезпечуючи посттрансляційну модифікацію вітамін-К-залежних протеїнів, активно задіяні у механізмах гемостазу та ектопічної кальцифікації судин. Ураховуючи важливе значення цих процесів для патогенезу атеросклерозу, можна з упевненістю вести мову про причетність *VKORC1* і *GGCX* та їх генетичного поліморфізму до розвитку поширених серцево-судинних захворювань.

1.3 Поліморфізм генів циклу вітаміну К та їх зв'язок із розвитком серцево-судинних захворювань

Ген VKORC1. Одне з основних повідомлень щодо локалізації гена *VKORC1* було одержано після вивчення сімейного дефіциту факторів згортання крові (FMFD). FMFD – це рідкісне генетичне захворювання з аутосомно-рецесивним типом успадкування, що проявляється частими кровотечами і характеризується неадекватним γ -карбоксілюванням II, VII, IX та X факторів згортання крові. Fregin et al. досліджували два покоління з FMFD із підозрою на мутації в гені *VKORC1*, що біохімічно проявлялися підвищенням співвідношення вітамін-К-епоксиду до гідроксіону вітаміну К. Методом широкогеномного сканування було виявлено маркер на хромосомі 16, а аналіз гаплотипів підтвердив гомозиготність за хромосомним регіоном 16p12-q21 в одному з поколінь [126].

У номері журналу “Nature” від 5 лютого 2004 року були опубліковані незалежно одна від іншої дві статті, що повідомляли про ідентифікацію гена *VKORC1* [130, 158]. Група Rost et al. секвенувала геномну ДНК в 4 Мб регіоні 16-ї хромосоми від 2 пробандів із FMFD і 4 незв'язаних пацієнтів із резистентністю до варфарину. Дослідниками був локалізований ген, що містив 5126 пар нуклеотидів. Виявлену ділянку ДНК автори назвали геном субодиниці 1 вітамін-К-епоксидредуктазного комплексу (*VKORC1*). Кожен пацієнт зі стійкістю до варфарину мав унікальний місенс-однонуклеотидний поліморфізм у новому гені, в той час як пацієнти з FMFD були гомозиготами за ідентичним С292Т-місенс-поліморфізмом, що спричиняв до заміни аргініну на триптофан у 98-му положенні протеїну.

Колектив Li et al. для виявлення *VKORC1* в хромосомному регіоні 16p12-q21 використовували позиційне клонування. Вони зосередили свою увагу на 13 генах-кандидатах із невідомою функцією, послідовність яких передбачала трансмембранне положення білків, що вони їх кодуєть. За допомогою інтерферуючих РНК дослідники секвенували кожен ген у

клітинній лінії карциноми легені. Було встановлено, що активності *VKOR* відповідає MGC11276 мРНК, що відображається на 16p11.2-регіоні.

На сьогодні відомо, що ген субодиниці 1 вітамін-К-епоксидредуктазного комплексу в людини розміщений на короткому плечі 16-ї хромосоми (16p11.2) і представлений однією копією. Довжина гена – 5126 нуклеотидів, він складається з 3 екзонів, розділених двома інтронами. У гені заковано 163 амінокислотні залишки зрілого білка-ферменту. За даними The National Center for Biotechnology Information у гені *VKORC1* людини розміщено 605 SNP. Найкраще дослідженими у контексті зв'язку із захворюваннями серця і судин є чотири SNP: поліморфізм промотору G-1639A (rs9923231), поліморфізм першого інтрона C1173T (rs9934438), поліморфізм другого інтрона C2255T (rs2359612) та поліморфізм 3'-UTR-ділянки G3730A (rs7294).

Дослідження алельного поліморфізму гена *VKORC1* тривалий час були сфокусовані на вивченні його впливу на метаболізм кумаринових коагулянтів та застосуванні одержаних результатів у призначенні оптимальної дози препаратів пацієнтам із різними поліморфними варіантами гена. Серед перших досліджень у цьому напрямі були роботи Rieder et al., які довели зв'язок G6853C-поліморфізму (rs17886369) гена *VKORC1* із різним рівнем його експресії та зробили висновок про те, що ця заміна визначає 21–25 % варіабельності дози варфарину [88]. Авторами встановлено, що у носіїв алеля 6853G рівень ендогенної епоксидредуктазної активності вищий, тому вони повинні отримувати більшу дозу антикоагулянту. Крім того, вчені обґрунтували середню терапевтичну дозу варфарину для представників різних генотипів: 6,0–6,2 мг на добу для гомозигот за основним алелем G/G, 4,3–4,9 мг для гетерозигот C/G і 2,7–3,4 мг для гомозигот за мінорним алелем C/C. Подальші дослідження довели залежність дози варфарину ще від двох SNP: поліморфізму G-1639A (rs9923231) промоторної ділянки [251] і C1173T (rs9934438) першого інтрона [12]. Вченими доведено, що

варфариннечутливі пацієнти мали у -1639-му положенні гена вітамін-К-епоксидоредуктази G-алель, тоді як варфаринчутливі – переважно А-алель.

Сьогодні для коригування дози оральних антикоагулянтів використовують визначення генотипу пацієнта за п'ятьма SNP у гені *VKORC1*: T-4931C (rs719616114), G-1639A (rs9923231), C1173T (rs9934438), G1542C (rs8050894), C7566T (rs2359612), які утворюють два основних гаплотипи. Гаплотип А включає мінорні алелі та асоційований зі зниженням продукції мРНК і меншою добовою дозою похідних кумарину порівняно з гаплотипом В, що об'єднує алелі дикого типу [193].

Другим важливим напрямом досліджень функціонального значення генетичного поліморфізму *VKORC1* з огляду участі вітамін-К-залежних білків у підтриманні кальцієвого гомеостазу в організмі став пошук зв'язку поліморфних варіантів гена з розвитком уражень серцево-судинної та кісткової систем. Було доведено, що представники білої раси, які є носіями мінорного Т-алеля за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1*, мають значно більший ризик розвитку кальцифікації аорти, ніж носії основного С-алеля [241]. Крім того, показано, що наявність 2255С-алеля (Т2255С-поліморфізм) збільшує ризик розвитку інсульту та ішемічної хвороби серця вдвічі, а ризик розшарування аорти – більше ніж утричі [250].

Проте Lemmens et al. одержали інші результати. Вчені не виявили зв'язку С1173Т-поліморфізму з розвитком ішемічної хвороби серця та інсультом серед населення Західної Європи [139]. Hindorff et al. довели відсутність асоціації Т2255С-, С698Т- та G3730А-поліморфізмів гена *VKORC1* із розвитком таких серцево-судинних захворювань, як інфаркт міокарда, інсульт та венозна тромбоемболія [71]. Verstuuyft et al. підтвердили висновок колег про відсутність зв'язку з венозною тромбоемболією для Т2255С-поліморфізму [165], а Smadja et al. – для нуклеотидної заміни G-1639А [164].

Ген GGCX. Після ідентифікації гена *GGCX* у ньому було описано більше ніж 30 мутацій, що спостерігались у пацієнтів із розладами,

пов'язаними із вітаміном К [59]. Результати вивчення деяких таких мутацій надали цінну інформацію про функцію зрілого ферменту. Впродовж тривалого часу вважалося, що дефекти вітамін-К-залежного карбоксилювання проявляють себе лише розладами гемостазу, що одержало назву недостатності вітамін-К-залежних факторів згортання (vitamin K-dependent coagulation factors deficiency (VKCFD)) [159]. Нещодавні дослідження показали, що мутації в гені *GGCX* також стосують розвитку фенотипу, подібного до псевдоксантоми еластикум (PXE-like syndrome) [190]. Цей синдром характеризується ектопічною мінералізацією тканин шкіри, очей і тканин серцево-судинної системи [189]. Було виявлено, що у пацієнтів із вказаним захворюванням спостерігається знижена концентрація матричного Gla-протеїну. Поряд із цим у деяких осіб установлено поєднання фенотипу псевдоксантоми еластикум із порушеннями коагуляційного гемостазу [190].

Поліморфізм гена GGCX. Ген *GGCX* людини розміщений на короткому плечі 2-ї хромосоми (2p12) і має 1 копію у геномі. Він має довжину 13151 нуклеотид і складається з п'ятнадцяти екзонів. У нуклеотидній послідовності інтронів виявлено 10 Alu-повторів типів J і S (підтипи Sq, Sx, Sp), з якими пов'язують розвиток низки патологічних процесів та хвороб, зокрема злоякісних пухлин [29].

Сайт ініціації транскрипції знаходиться у 515-й позиції гена γ -глутамілкарбоксилази. У клітинах людини синтезується мРНК двох типів (2,7 кб та 3,6 кб). Довша має Alu Sx-повтори між першою і другою полі-А-послідовністю. Доведено, що Alu-повтори можуть бути зв'язувальним сайтом для рецептора ретиноевої кислоти та підвищувати рівень транскрипції у 35 разів [238].

Zhu et al. вивели лінію мишей, нокаутуваних за геном *GGCX*, які помирали при народженні від масивних кровотеч [23]. Вчені виявили у тварин аномалії розвитку головного мозку та лицевого черепа, подібні до людського синдрому тератогенного варфарину.

На сьогодні описано понад 1 600 поліморфізмів поодиноких нуклеотидів у гені γ -глутамілкарбоксилази людини (за даними The National Center for Biotechnology Information). Доведено, що частина з них асоційована з дозуванням непрямих оральних антикоагулянтів.

Одними з перших ген *GGCX* секвенували Rieder et al., які виявили в ньому 37 SNP: 3 – у промоторі; 5 – у кодуєчій частині гена, 7 – у ділянці 3'-кінця і 22 – в інтронах. Для подальших досліджень авторами було обрано шість поліморфізмів (у позиціях 4046, 10067, 12970, 13333, 14101 і 14599). Зв'язок із дозою варфарину виявився лише для поліморфізму 14-го інтрона C12970G, який мав хоч і незначний, але статистично значущий вплив на дозу препарату (5,4 мг/добу для осіб із G/G-генотипом, 4,6 мг/добу для носіїв основного алеля) [198]. Асоціація з дозою оральних антикоагулянтів для поліморфізму G6317A (rs12714145) була доведена Shikata et al. Авторами показано, що доза варфарину зростає разом зі збільшенням кількості мікросателітних повторів у 6-му інтроні гена *GGCX* [53]. У дослідженні King et al. показано, що на дозування похідних кумарину впливає поліморфізм C12970G (rs11676382). Для гомозигот за мінорним алелем і гетерозигот доза варфарину була достовірно нижчою (3,8 мг/добу), ніж для гомозигот за основним алелем (4,9 мг/добу) [106].

Ураховуючи участь *GGCX* у посттрансляційній модифікації остеокальцину та MGP, які відіграють важливу роль у метаболізмі кальцію, Kinoshita et al. припустили, що варіабельність гена *GGCX* може бути пов'язана з розвитком остеопорозу [16]. Дослідниками була виявлена асоціація Arg325Gln-поліморфізму з показниками мінеральної щільності кісток серед японських жінок похилого віку. Цей показник був достовірно вищим у гомозигот за мінорним алелем (Gln/Gln), ніж у носіїв основного алеля (Arg/Arg, Arg/Gln). Дослідницька група Watzka et al. не виявила впливу поліморфних варіантів генів *VKORC1*, *NQO1* і *GGCX* на вміст вітамін-К-залежних факторів згортання крові у німецькій популяції [178]. У роботі Marieke et al. не встановлений зв'язок між гаплотипами генів циклу вітаміну

К (*VKORC1* та *GGCX*) та ймовірністю розвитку венозного тромбозу. Проте було показано, що активність II фактора коагуляції крові залежала від гаплотипу H1 гена *GGCX* [121].

Щодо ролі поліморфних сайтів гена *GGCX* у розвитку ішемічного інсульту, то таких досліджень небагато. Так, Shyu et al. виявили статистично значущий протективний ефект поліморфізмів Arg325Gln (ген *GGCX*), G-1639A (ген *VKORC1*) та Pro187Ser (ген *NQO1*) щодо ризику розвитку ішемічного інсульту [113]. Vanakker et al. виявили, що поліморфізм Arg325Gln у 8-му екзоні гена *GGCX* знижує карбоксилазну активність та індукує дефіцит вітамін-К-залежних факторів згортання крові. Було зроблено висновок, що генетична варіабельність *GGCX* є значущим предиктором неонатальних кровотеч [103]. Kimura et al. вивчаючи вплив поліморфізмів генів *GGCX*, *VKORC1* та *CALU* на активність С- та S-протеїнів у японській популяції встановили, що жінки-гомозиготи за основним алелем (Arg325Gln-поліморфізм гена *GGCX*) мають достовірно вищий рівень активності протеїну С, ніж гетерозиготи та гомозиготи за мінорним алелем [177].

Отже, дані про зв'язок алельного поліморфізму генів циклу вітаміну К із серцево-судинними хворобами неоднозначні та контроверсійні, що спонукало нас до подальшого вивчення ролі поліморфних варіантів генів *VKORC1* та *GGCX* у розвитку одного з найпоширеніших та найтяжчих ускладнень атеросклерозу – ішемічного атеротромботичного інсульту.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика клінічного матеріалу

Для дослідження була використана венозна кров 170 хворих з ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік $(64,7 \pm 0,73)$ року), які перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні № 5. Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу та клінічної картини хвороби, результатами МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) [67] на підставі даних анамнезу, особливостей клінічного перебігу хвороби, результатів ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови та ЕКГ. Пацієнти з лакунарним, кардіоемболічним ішемічним інсультом та ішемічним інсультом нез'ясованої етіології виключались із дослідної групи.

Групу контролю становили 124 особи, в яких відсутність гострої серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску та проведення загальноприйнятого неврологічного огляду.

Роботу виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження», Наказу МОЗ України № 690 (від 23.09.2009 р.) та схвалено Комісією з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету. Перед залученням до дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду.

Клінічна характеристика 170 пацієнтів з ІАТІ та 124 осіб контрольної групи подана у таблиці 2.1.1. Показано, що статистично значуща різниця між групами порівняння не була виявлена під час аналізу за співвідношенням

осіб різної статі ($P = 0,294$), середніми показниками ІМТ ($P = 0,279$), кількістю осіб із надмірною вагою ($P = 0,197$) та кількістю курців ($P = 0,403$). Поряд із цим середні значення маси тіла, зросту, систолічного АТ, діастолічного АТ, концентрації глюкози крові, а також кількість осіб з артеріальною гіпертензією у хворих з ІАТІ були істотно вищими, ніж у контролі ($P < 0,05$). При цьому середній вік представників контрольної групи ($(76,7 \pm 10,2)$ року) був значущо вищим, ніж у пацієнтів з інсультом ($P < 0,001$). Останнє збільшувало надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ІАТІ в цих осіб у подальших періодах їх життя.

Таблиця 2.1.1 – Загальна клінічна характеристика пацієнтів з ІАТІ та осіб контрольної групи

Показник	Хворі з ІАТІ (n = 170)	Контрольна група (n = 124)	P
Вік, років	$64,7 \pm 0,73$	$76,7 \pm 0,93$	$< 0,001$
Стать, ж/ч	72/98	45/79	0,294
Маса тіла, кг	$80,5 \pm 0,99$	$75,6 \pm 1,33$	$< 0,001$
Зріст, см	$168,9 \pm 0,62$	$163,2 \pm 0,91$	$< 0,001$
ІМТ, кг/м ²	$28,2 \pm 4,3$	$27,6 \pm 5,0$	0,279
Надмірна вага (%)	129 (75,9)	85 (69,1)	0,197
САТ, мм рт. ст.	$167 \pm 2,3$	$152,6 \pm 2,1$	$< 0,001$
ДАТ, мм рт. ст.	$95,4 \pm 1,2$	$86,3 \pm 1,1$	$< 0,001$
Артеріальна гіпертензія (%)	128 (75,3)	73 (60,3)	0,006
Курці (%)	50 (29,4)	31 (25,0)	0,403
Глюкоза крові, ммоль/л	$5,92 \pm 0,12$	$5,29 \pm 0,06$	$< 0,001$

Примітка: n – кількість пацієнтів; ж – жінки; ч – чоловіки; P – статистична значущість відмінностей. Категоріальні змінні були порівняні за допомогою χ^2 -тесту, кількісні змінні – за допомогою *t*-тесту

У таблиці 2.1.2 наведені показники ліпідного обміну та коагулограми пацієнтів з ішемічним атеротромботичним інсультом загалом та у підгрупах за статтю. Як бачимо, у жінок з ІАТІ вміст загального холестеролу, ЛПДНГ

та тригліцеридів був значущо вищим, ніж у хворих чоловіків ($P = 0,035$, $P = 0,024$ та $P = 0,024$ відповідно). Концентрація ЛПНГ, ЛПВГ та значення індексу атерогенності не відрізнялися в осіб різної статі ($P > 0,05$). Щодо показників коагулограми, то жінки мали нижчі значення протромбінового часу ($P = 0,001$) та більший вміст фібриногену ($P = 0,005$), ніж особи протилежної статі. Різниці у середніх значеннях тромбінового часу та фібринолітичної активності між представниками обох статей виявлено не було ($P > 0,05$).

Таблиця 2.1.2 – Показники ліпідограми та коагулограми пацієнтів з ішемічним атеротромботичним інсультом

Характеристика	Загалом (n = 170)	Жінки (n = 72)	Чоловіки (n = 98)	P
Ліпідограма				
Загальний ХС, ммоль/л ^a	5,05 ± 0,12	5,34 ± 0,19	4,83 ± 0,15	0,035
ХС-ЛПНГ, ммоль/л ^a	3,26 ± 0,11	3,46 ± 0,18	3,10 ± 0,14	0,117
ХС-ЛПДНГ, ммоль/л ^a	0,77 ± 0,03	0,85 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,024
ХС-ЛПВГ, ммоль/л ^a	1,02 ± 0,02	1,03 ± 0,04	1,01 ± 0,03	0,672
Тригліцериди, ммоль/л ^a	1,70 ± 0,06	1,86 ± 0,09	1,58 ± 0,08	0,024
Індекс атерогенності ^a	4,79 ± 0,28	5,17 ± 0,46	4,51 ± 0,35	0,242
Коагулограма				
Протромбіновий час, с	9,48 ± 0,16	8,86 ± 0,20	9,93 ± 0,21	0,001
Тромбіновий час, с	16,5 ± 0,27	16,9 ± 0,49	16,3 ± 0,31	0,225
Фібриноген, г/л	3,93 ± 0,09	4,23 ± 0,16	3,71 ± 0,11	0,005
Спонтанний фібриноліз, хв	479,3 ± 2,8	479,8 ± 4,0	478,0 ± 3,9	0,886

Примітка: n – кількість пацієнтів; ХС – холестерол; ЛПНГ – ліпопротеїни низької густини; ЛПДНГ – ліпопротеїни дуже низької густини; ЛПВГ – ліпопротеїни високої густини; P – значущість відмінностей між жіночою і чоловічою статями;

^a n = 68 для жінок; n = 89 для чоловіків

Клінічну характеристику інфаркту головного мозку в пацієнтів обох статей залежно від тяжкості клінічного перебігу та повторності наведено у таблиці 2.1.3.

Ступінь тяжкості ІАТІ визначали за шкалою NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale, США) [167]. Відповідно до цього всі хворі були поділені на три підгрупи: 1) із легким ступенем тяжкості; 2) із середнім ступенем тяжкості; 3) із тяжким перебігом. Клінічний перебіг легкого ступеня характеризувався невираженим неврологічним дефіцитом, що повністю регресував упродовж 21 доби. ІАТІ середньої тяжкості виявляв себе наявністю стійкої вогнищевої неврологічної симптоматики на фоні збереженої свідомості. Для важкого ступеня була властива виражена загально мозкова симптоматика з пригніченням свідомості, ознаками набряку головного мозку, значним неврологічним дефіцитом та вегетативними розладами.

Таблиця 2.1.3 – Клінічна характеристика ішемічного інсульту в осіб різної статі

	Жінки (%)	Чоловіки (%)	Загалом (%)
За тяжкістю			
Легкий	26 (36,1)	29 (29,6)	55 (32,4)
Середньої тяжкості	25 (34,7)	41 (41,8)	66 (38,8)
Тяжкий	21 (29,2)	28 (28,6)	49 (28,8)
$\chi^2 = 1,091; P = 0,579$			
За повторністю			
Первинний	51 (70,8)	54 (55,1)	105 (61,8)
Повторний	21 (29,2)	44 (44,9)	65 (38,2)
$\chi^2 = 4,349; P = 0,037$			

Примітка. У дужках – %

Таким чином, серед загальної кількості пацієнтів з ІАТІ 32,4 % мали легкий перебіг, 38,8 % – перебіг середньої тяжкості, 28,8 % – тяжкий перебіг. Співвідношення осіб із різним ступенем тяжкості клінічного перебігу ішемічного інсульту не відрізнялось у підгрупах, утворених за статтю ($P = 0,579$). Щодо повторності ІАТІ, то 61,8 % пацієнтів мали вперше

перенесений ішемічний інсульт, тоді як у 38 % осіб спостерігався повторний інфаркт головного мозку. При цьому виявлено, що повторний ІАТІ виникав частіше в чоловіків, ніж в осіб жіночої статі ($P = 0,037$).

2.2 Молекулярно-генетичні дослідження

Венозну кров у хворих з ІАТІ та осіб групи порівняння набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із додаванням калієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 мМ) як антикоагулянта ("Sarstedt", Німеччина), заморожували та зберігали за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Забір крові для досліджень проводили кваліфіковані спеціалісти в клінічних умовах із додержанням усіх правил медичної асептики та антисептики.

Виділення ДНК із цільної крові проводили з використанням наборів DIAtom DNA Prep 200 («Isogene», Росія). Згідно з цим методом зразки крові лізуються в присутності Протеїнази К у лізуючому буфері. Потім лізат змішується з етанолом і вноситься в спін-колонку, де ДНК оборотно зв'язується на мембрані з кремнезему. Домішки ефективно видаляють промиванням спін-колонки приготованими промивними буферами. Потім геномну ДНК елюють в умовах низької іонної сили елюючим буфером.

Ампліфікація. Алельний поліморфізм G-1639A (rs9923231) промотору гена *VKORC1*, C1173T (rs9934438) першого інтрона гена *VKORC1*, Arg406Arg (rs2592551) дев'ятого екзона гена *GGCX* вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) із подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Використовували праймери, синтезовані фірмою "Metabion" (Німеччина), та ферменти (Taq-полімераза і рестриктази) фірми "ThermoFisher Scientific" (США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 50–100 нг ДНК, 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,5 ОД Taq-полімерази. Режими PCR, які для кожного поліморфізму склалися із 33 циклів, наведені в таблиці 2.2.1. Реакцію

проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 (ThermoFisher Scientific, США).

Таблиця 2.2.1 – Методика проведення PCR

Ген, поліморфізм	Нуклеотидна послідовність праймерів	Режим ампліфікації		
		D	H	E
<i>VKORC1</i> , G-1639A	П: 5'-GCCAGCAGGAGAGGGAAATA-3' З: 5'- AGTTTGGACTACAGGTGCCT-3'	94°C, 50 с	61°C, 45 с	72°C, 50 с
<i>VKORC1</i> , C1173T	П: 5`-AAGATGAAAAGCAGGGCCTAC-3` З: 5`- CCGAGAAAGGTGATTTCCAA-3`	94°C, 50 с	60°C, 50 с	72°C, 55 с
<i>GGCX</i> , Arg406Arg	П: 5`- GGACTTAGAAAGGAACGGATGA-3` З: 5`- CTTGAGAAAAGGCAAAGCAGAC-3`	94°C, 50 с	61,5°C, 45 с	72°C, 60 с

Примітка: П – прямий праймер; З – зворотний праймер; D – денатурація; H – гібридизація праймерів; E – елонгація

Рестрикційний аналіз поліморфізму G-1639A гена VKORC1

Продукт ампліфікації (6 мкл) інкубували при 37 °C упродовж 18 годин із 5 ОД рестриктази *MspI* (*HpaII*) у буфері Tango такого складу: 33 мМ трис-ацетату (рН 7,9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в -1639-й позиції гена *VKORC1* містився гуанін, ампліфікат, що складався з 290 пар основ, розщеплювався рестриктазою *MspI* на два фрагменти – 168 і 122 пари основ. У разі заміни гуаніну на аденін сайт рестрикції для *MspI* втрачався, і в гелі візуалізувався один фрагмент завдовжки 290 пар основ (рис. 2.2.1).

Рестрикційний аналіз поліморфізму C1173T гена VKORC1

Продукт ампліфікації (6 мкл) інкубували при 37 °C упродовж 18 годин із 3 ОД рестриктази *StyI* (*Eco130I*) у буфері O такого складу: 50 мМ трис-хлору (рН 7,5), 10 мМ дихлориду магнію, 100 мМ хлориду натрію, 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 1173-й позиції гена *VKORC1* цитозину перешкоджала рестрикції, а при заміні цитозину на тимін рестриктаза *StyI* розщеплювала ампліфікований фрагмент довжиною 195 пар азотистих основ на два фрагменти: 125 та 70 пар основ (рис. 2.2.2).

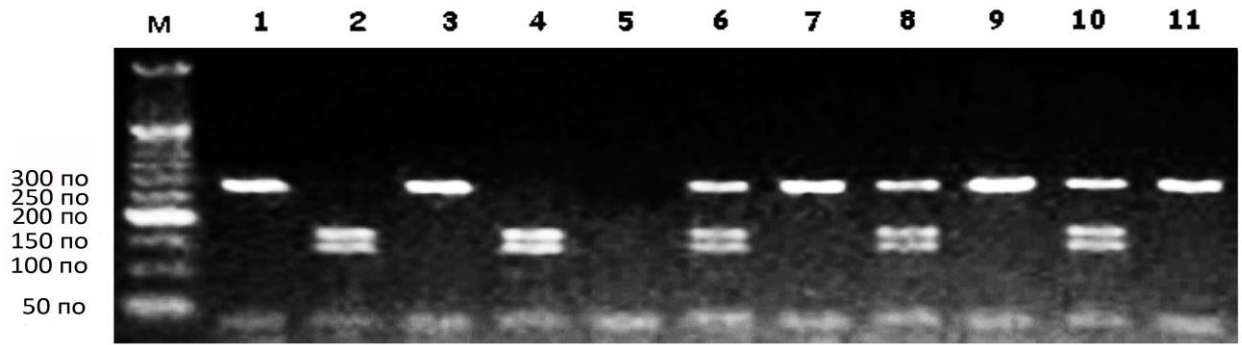


Рисунок 2.2.1 – Результати рестрикційного аналізу G-1639A поліморфізму гена *VKORC1*. М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 2,4 відповідають G/G-генотипу; доріжки 6,8,10 – G/A-генотипу; доріжки 1,3,7,9,11 – A/A-генотипу; доріжка 5 – проба без ДНК пацієнта

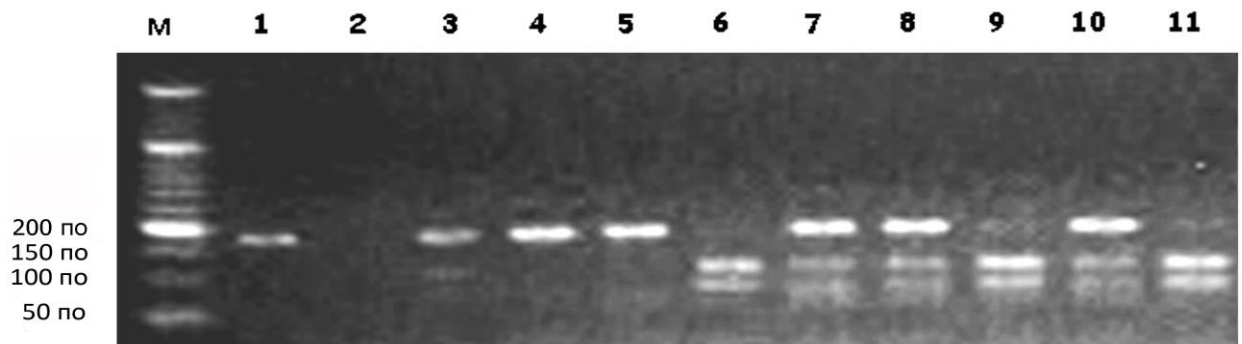


Рисунок 2.2.2 – Результати рестрикційного аналізу C1173T поліморфізму гена *VKORC1*. М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 1,3,4,5 відповідають C/C-генотипу; доріжки 7,8,10 – C/T-генотипу; доріжки 6,9,11 – T/T-генотипу; доріжка 2 – проба без ДНК пацієнта

Визначення алельного поліморфізму Arg406Arg 9-го екзона гена GGCX

Продукт ампліфікації (6 мкл) інкубували при 37 °С упродовж 20 годин із 5 ОД рестриктази *MbiI* у буфері Tango такого складу: 33 мМ трисацетату (рН 7,9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 8527-й позиції гена *GGCX* містився цитозин, ампліфікат, який складався з 381 пари основ, розщеплювався рестриктазою *MbiI* на два фрагменти – 189 і 192 пари основ. У разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для *MbiI* втрачався, а в гелі візуалізувався один фрагмент завдовжки 381 пара основ (рис. 2.2.3).

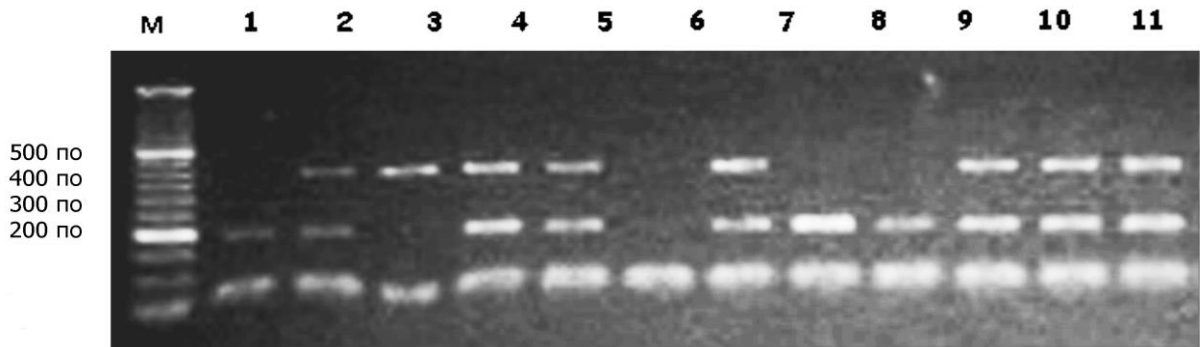


Рисунок 2.2.3 – Результати рестрикційного аналізу поліморфізму Arg406Arg гена *GGCX*. М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 1, 8, 9 відповідають С/С-генотипу; доріжки 2, 4, 5, 7, 10, 11 – С/Т-генотипу; доріжка 3 – Т/Т-генотипу; доріжка 6 – проба без ДНК пацієнта

Ампліфікати після рестрикції розділяли за допомогою горизонтального електрофорезу (напряга електричного поля 10 В/см) в 1,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

2.3 Методи статистичного аналізу

Основну частину статистичного аналізу було проведено з використанням програми SPSS (версія 17.0, США). Безперервні дані наведені у вигляді середнього значення $\pm m$, номінальні дані подані у вигляді кількісних та відсоткових значень. Перевірку безперервних даних на нормальність розподілу здійснювали за допомогою тесту Шапіро – Вілка. Визначення достовірності відмінностей між двома вибірками проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді – Вайнберга перевіряли послуговуючись Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах застосовували χ^2 -критерій Пірсона. Достовірність відмінностей середніх величин у групах із

різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшою поправкою Бонфероні.

Для встановлення ризику розвитку ІАТІ залежно від наявності в пацієнта певного генотипу за допомогою бінарної логістичної регресії розраховували відношення шансів (OR) та 95 % довірчий інтервал (CI) для чотирьох основних моделей успадкування: домінантна (референс – гомозиготи за основним алелем), рецесивна (референс – генотипи з основним алелем), наддомінантна (референс – гомозиготи за основним та мінорним алелями) та адитивна (гетерозиготи та гомозиготи за мінорним алелем проти гомозигот за основним алелем в якості референсного генотипу). Релевантність моделей успадкування в кожній окремій підгрупі оцінювали за допомогою інформаційного критерію Акайке, який розраховували з використанням онлайн-ресурсу СНП'Ка (<https://thething.shinyapps.io/SNPcalc/>). Після цього для підвищення надійності аналізу та зменшення ймовірності одержання хибних результатів була використана мультіваріабельна логістична регресія. Остання поряд із генотипом дозволяє як коваріати вносити в регресійне рівняння відомості про стать, вік, ІМТ, артеріальну гіпертензію та звичку палити. Таким чином, дослідження асоціації генотипів із розвитком ішемічного інсульту проводили в умовах поправки на інші наявні в особи фактори ризику атеросклерозу.

Для розрахунку частоти гаплотипів та аналізу нерівноважного зчеплення (linkage disequilibrium (LD)) використовували програму Arlequin (версія 3.1). Моделювання міжлокусних взаємодій для вивчення поєданого впливу поліморфізму генів циклу вітаміну К на розвиток ІАТІ реалізовували за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності (MDR) [27].

Усі тести були двосторонніми, значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розкриття генетичної складової поширених мультифакторіальних хвороб людства належить до основних задач сучасної медицини. Одним із важливих методів, що використовується сьогодні для виявлення спадкової схильності до тих чи інших захворювань, є аналіз однонуклеотидного поліморфізму генів.

Ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) – це гостре порушення церебрального кровообігу, що відбувається в результаті атеросклерозу мозкових артерій, ускладненого формуванням тромбів [77, 202]. До основних причин розвитку ІАТІ на сьогодні відносять порушення активності гетерогенної групи вітамін-К-залежних білків, що виникає внаслідок розладів процесів γ -карбоксилювання у циклі вітаміну К. Функціонування цієї біохімічної системи багато в чому залежить від вітамін-К-епоксидредуктази та γ -глутамілкарбоксилази. Саме тому в нашій роботі було проведено визначення поліморфних сайтів генів цих ферментів та реалізований аналіз їх асоціації з розвитком ішемічного інсульту атеротромботичного генезу.

3.1 Зв'язок G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту

Однонуклеотидний поліморфізм G-1639A (rs9923231) пов'язаний із заміною гуаніну на аденін у -1639 положенні промотору гена *VKORC1*. Це виявляє себе перебудовою E-боксу та призводить до пригнічення швидкості утворення мРНК.

Частоту дикого (G) та мінорного (A) алелів, а також розподіл гомозигот за основним алелем (G/G), гетерозигот (G/A) та гомозигот за мінорним алелем (A/A) за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* у хворих з ІАТІ та представників контрольної групи наведено в табл. 3.1.1. Показано, що

частоти наведених генотипів в обох групах відповідали рівновазі Харді – Вайнберга ($P > 0,05$).

Таблиця 3.1.1 – Частота алелів та генотипів за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* у групах порівняння

	Контрольна група	Хворі з ІАТІ
Гомозиготи G/G, n (%)	54 (43,5)	49 (28,8)
Гетерозиготи G/A, n (%)	49 (39,6)	79 (46,5)
Гомозиготи A/A, n (%)	21 (16,9)	42 (24,7)
G-алель	0,63	0,52
A-алель	0,37	0,48
χ^2	2,77	0,81
P	> 0,05	> 0,05

Примітка: n – кількість пацієнтів; χ^2 і P відображають відхилення у кожній групі від рівноваги Харді – Вайнберга

На рисунку 3.1.1 подані результати порівняння частот алелів і трьох можливих варіантів генотипів, утворених за поліморфізмом промотору гена *VKORC1*, між особами дослідної та контрольної груп.

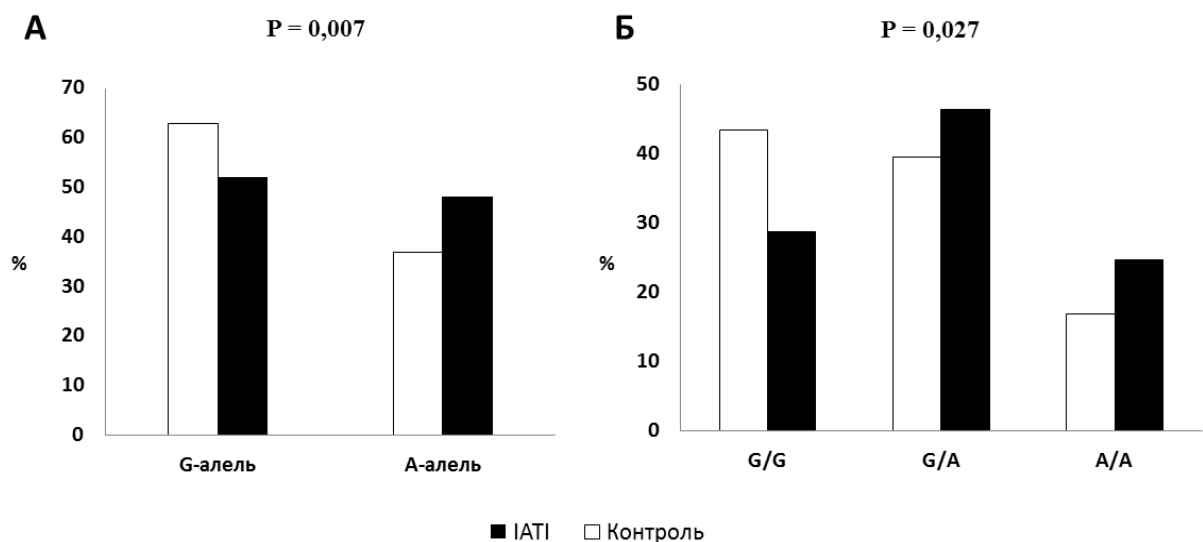


Рисунок 3.1.1 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Показано, що мінорний А-алель достовірно частіше спостерігався серед пацієнтів з ішемічним інсультом ($P = 0,007$). Поряд із цим статистично значущим виявилася також і відмінність розподілу генотипів за досліджуваним поліморфним локусом між хворими з ІАТІ та особами групи контролю ($P = 0,027$).

Результати аналізу зв'язку генотипів за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* з ІАТІ за допомогою бінарної та мультіваріабельної логістичної регресії в рамках чотирьох моделей успадкування наведені в табл. 3.1.2.

Статистично значущий зв'язок був установлений для домінантної ($P_{\text{спост}} = 0,009$) та адитивної ($P_{\text{спост}} = 0,032$ – для G/A-генотипу; $P_{\text{спост}} = 0,017$ – для A/A-генотипу) моделей. Ризик розвитку ішемічного інсульту в носіїв мінорного алеля (G/A- та A/A-генотипи) був у 1,9 (95 % CI = 1,172–3,097) разів вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (G/G) (відповідно до домінантної моделі).

Таблиця 3.1.2 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,009	1,905 (1,172–3,097)	0,015	2,138 (1,157–3,953)	19,27
Рецесивна	0,111	1,609 (0,897–2,888)	0,142	1,780 (0,824–3,847)	23,46
Наддомінантна	0,235	1,329 (0,831–2,125)	0,226	1,434 (0,800–2,571)	24,66
Адитивна ^a	0,032	1,777 (1,050–3,006)	0,041	1,979 (1,029–3,805)	20,83
	0,017	2,204 (1,149–4,227)	0,028	2,621 (1,110–6,191)	

Примітка: 95 % CI – 95 % довірчий інтервал; ІКА – інформаційний критерій Акайке; $P_{\text{спост}}$ – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR_{спост} – спостережуване відношення шансів; $P_{\text{попр}}$ – значення P після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ та АГ у загальній групі; поправки на вік, звичку палити, ІМТ та АГ у підгрупах за статтю; поправки на вік, стать, звичку палити та АГ у підгрупах за ІМТ; поправки на вік, стать, ІМТ та АГ у підгрупах за звичкою палити; OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріати.

^a Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння G/A-генотипу з G/G-генотипом, другий рядок – порівняння A/A-генотипу з G/G-генотипом.

Розрахунок відносного ризику в рамках адитивної моделі показав, що у гетерозигот (G/A) ризик ІАТІ був у 1,8 (95 % CI = 1,050–3,006), а у гомозигот

за мінорним алелем (A/A) – у 2,2 (95 % CI = 1,149–4,227) раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (G/G). Після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ та артеріальну гіпертензію достовірність цих результатів зберігалась, а ризики збільшувалися. Так, у рамках домінантної моделі показник $P_{\text{попр}}$ дорівнював 0,015 ($OR_{\text{попр}} = 2,138$; 95 % CI = 1,157–3,953), у рамках адитивної моделі для G/A-генотипу показник $P_{\text{попр}}$ становив 0,041 ($OR_{\text{попр}} = 1,979$; 95 % CI = 1,029–3,805), для A/A-генотипу $P_{\text{попр}} = 0,028$ ($OR_{\text{попр}} = 2,621$; 95 % CI = 1,110–6,191). Щодо визначення найкращої моделі успадкування ознаки, то такою виявилася домінантна модель (ІКА = 19,27).

Аналіз за статтю. Співвідношення алелів G та A за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* у жінок з ІАТІ становило 52,1 % та 47,9 % (у контролі – відповідно 62,2 і 37,8 %). Розподіл гомозигот за основним алелем, гетерозигот та гомозигот за мінорним алелем за зазначеним поліморфним варіантом в осіб жіночої статі з інсультом становив 25,0, 54,2 та 20,8 % (у групі контролю – відповідно 40,0, 44,4 і 15,6 %). Результати аналізу за допомогою χ^2 -критерію показали, що частоти алелів та генотипів серед жінок дослідної та контрольної груп статистично значущо не відрізнялися ($P = 0,129$ та $P = 0,228$ відповідно) (рис. 3.1.2).

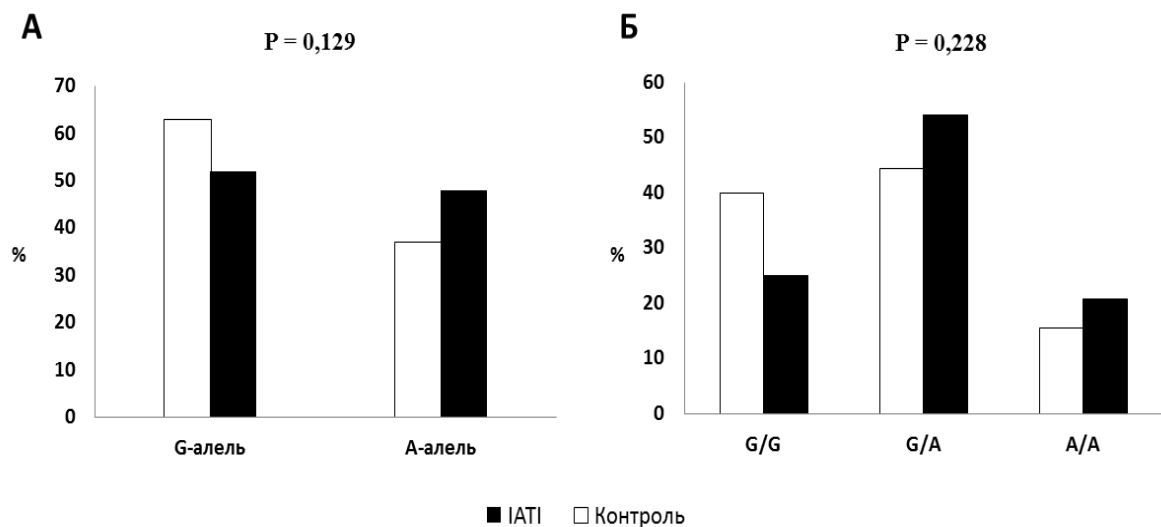


Рисунок 3.1.2 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* у жінок з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

У таблиці 3.1.3 наведені результати регресійного аналізу зв'язку між G-1639A поліморфним сайтом гена *VKORC1* та ІАТІ в осіб жіночої статі. Статистично достовірна асоціація без урахування факторів ризику атеросклерозу в рамках жодної моделі виявлена не була. Натомість після поправки на вік, ІМТ, артеріальну гіпертензію та звичку палити виявилось, що в жінок, які є носіями мінорного алеля, ризик розвитку ішемічного інсульту в 2,9 раза ($CI = 1,058-7,665$; $P_{\text{попр}} = 0,038$) вищий, ніж в осіб жіночої статі з G/G-генотипом (у рамках домінантної моделі). Водночас встановлено, що окремо у гетерозигот ризик ІАТІ також у 2,9 раза ($CI = 1,006-8,293$; $P_{\text{попр}} = 0,049$) вищий, ніж у жінок із генотипом G/G. Найменший показник критерію Акайке мала домінантна модель ($ІКА = 15,94$).

Таблиця 3.1.3 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб жіночої статі з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,090	2,000 (0,899–4,452)	0,038	2,848 (1,058–7,665)	15,94
Рецесивна	0,479	1,429 (0,533–3,832)	0,520	1,498 (0,437–5,135)	18,31
Наддомінантна	0,307	1,477 (0,699–3,124)	0,133	2,046 (0,804–5,207)	17,78
Аддитивна ^a	0,122	1,950 (0,836–4,549)	0,049	2,888 (1,006–8,293)	17,91
	0,178	2,143 (0,706–6,501)	0,149	2,747 (0,697–10,826)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2

Дослідження частоти алелів та генотипів окремо серед осіб чоловічої статі показало, що у хворих з ІАТІ основний алель спостерігався в 52,0 % випадків, а мінорний – у 48 % (у контрольній групі – у 63,9 та 36,1 % відповідно). На рисунку 3.1.3 наведені результати порівняння наведених частот між досліджуваними групами. Показано, що у чоловіків з ішемічним інсультом А-алель зустрічався достовірно частіше, ніж у представників контролю ($P = 0,025$). Співвідношення трьох варіантів генотипів серед чоловіків дослідної групи становило 31,6, 40,8 та 27,6 % (у контролі – 45,6,

36,7 і 17,7 % відповідно). При цьому відмінність у розподілі різних алельних варіантів за G-1639A-поліморфним сайтом гена *VKORC1* серед чоловіків груп порівняння статистично достовірною не була ($P = 0,119$).

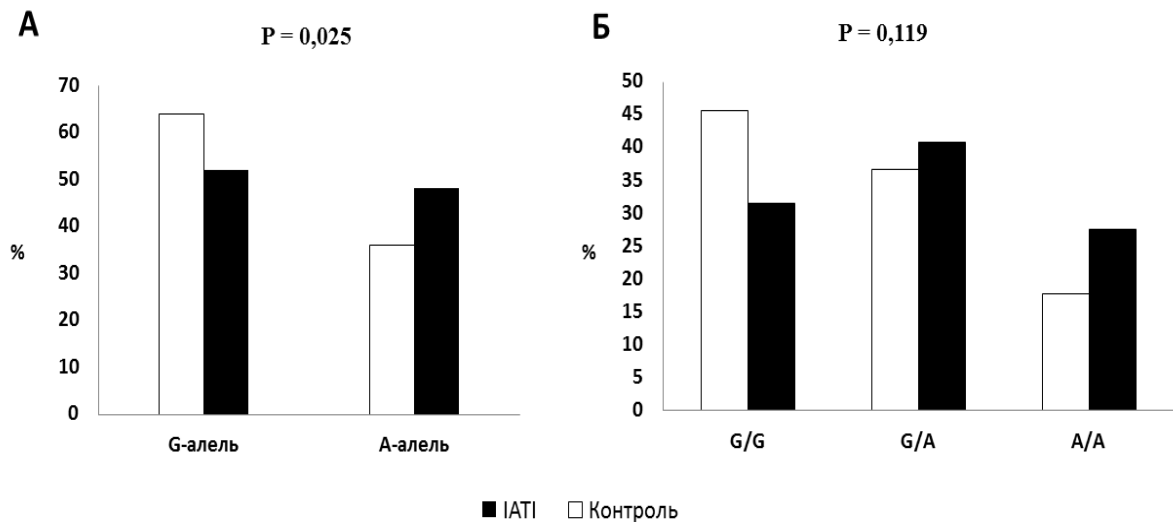


Рисунок 3.1.3 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* у чоловіків з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Вивчення зв'язку поліморфізму промотору гена *VKORC1* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в рамках чотирьох моделей успадкування продемонструвало, що у чоловіків із генотипом A/A ризик розвитку ІАТІ був у 2,2 раза ($CI = 1,002-5,007$; $P_{\text{спост}} = 0,049$) вищий, ніж у гомозигот за основним алелем цієї самої статі (табл. 3.1.4). Проте статистична значущість OR втрачалася після поправки на вік, ІМТ, артеріальну гіпертензію та звичку палити. Результати аналізу в рамках інших моделей не досягали статистичної значущості як до, так і після поправки на фактори ризику атеросклерозу. Найкращою моделлю виявилася домінантна ($ICA = 18,08$).

Таблиця 3.1.4 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена VKORC1 з ІАТІ в осіб чоловічої статі з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	P _{спост}	OR _{спост} (95 % CI)	P _{попр}	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,058	1,809 (0,979–3,344)	0,082	2,102 (0,911–4,582)	18,08
Рецесивна	0,126	1,766 (0,853–3,656)	0,196	1,958 (0,708–5,415)	19,27
Наддомінантна	0,578	1,189 (0,646–2,187)	0,521	1,292 (0,591–2,823)	21,37
Аддитивна ^a	0,173	1,602 (0,813–3,154)	0,166	1,872 (0,770–4,551)	19,40
	0,049	2,240 (1,002–5,007)	0,077	2,830 (0,894–8,959)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2

Аналіз за антропометричними даними. У дослідженні було проведено вивчення показників зросту, маси тіла, а також розраховано на їх основі індекс маси тіла (ІМТ) в осіб обох груп порівняння залежно від різних варіантів генотипів, утворених за G-1639A-поліморфізмом гена VKORC1 (табл. 3.1.4).

Результати аналізу продемонстрували, що серед представників контрольної групи не виявлено впливу поліморфізму промотору гена вітамін-К-епоксидредуктази на показники зросту, маси тіла та ІМТ (P = 0,408; P = 0,925; P = 809 відповідно). Розрахунок критерію Фішера у групі пацієнтів з ІАТІ також не виявив статистично значущих відмінностей під час аналізу за зростом (P = 0,196), масою тіла (P = 0,903) та ІМТ (P = 0,533).

Поряд із цим порівняння вищенаведених параметрів між представниками обох груп з однаковим генотипом показало, що у пацієнтів з ішемічним інсультом, які були гомозиготами за G/G-генотипом, зріст ((170,2 ± 1,09) см проти (162,3 ± 1,19) см; P < 0,001) та маса тіла ((81,1 ± 1,98) кг проти (73,5 ± 1,77) кг, P = 0,005) були значущо вищими, ніж у відповідних гомозигот групи контролю. Гетерозиготи з ІАТІ також мали більш високий зріст ((167,8 ± 0,92) см проти (163,3 ± 1,54) см; P = 0,009) та вагу ((80,4 ± 1,51) кг проти (73,2 ± 2,56) кг; P = 0,011), ніж особи групи порівняння. Проте достовірна різниця в показниках ІМТ для жодного з генотипів не була виявлена (P = 0,907 – для G/G-генотипу; P = 0,207 – для

G/A-генотипу; $P = 0,622$ – для A/A-генотипу). Останнє певною мірою можна пояснити пропорційністю відхилень параметрів зросту та ваги.

Таблиця 3.1.5 – Антропометричні показники у дослідній та контрольній групах залежно від генотипу за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1*, ($M \pm m$)

		Генотип			F	P ₁
		G/G	G/A	A/A		
Зріст, см	Контроль	162,3± 1,19 (54)	163,3±1,54 (48)	165,7±2,49 (21)	0,903	0,408
	IAT1	170,2±1,09 (49)	167,8±0,92 (79)	169,7±1,30 (42)	1,646	0,196
	P ₂	< 0,001	0,009	0,121		
Маса тіла, кг	Контроль	73,5±1,77	73,2±2,56	74,7±2,53	0,078	0,925
	IAT1	81,1±1,98	80,4±1,51	79,9±1,67	0,102	0,903
	P ₂	0,005	0,011	0,084		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	27,9±0,64	27,4±0,81	27,3±0,91	0,213	0,809
	IAT1	28,0±0,56	28,6±0,55	27,8±0,55	0,631	0,533
	P ₂	0,907	0,207	0,622		

Примітка: F – критерій Фішера; P₁ і P₂ – значущість відмінностей між генотипами за даними однофакторного дисперсійного аналізу (P₁) і між контролем та IAT1 за *t*-критерієм Стьюдента (P₂). У дужках – кількість пацієнтів

Аналіз залежності антропометричних показників від G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* в осіб різної статі засвідчив, що як у жінок, так і в чоловіків зазначений поліморфний локус статистично значущо не впливав на зріст, масу тіла та ІМТ осіб дослідної та контрольної груп (табл. 3.1.6).

Порівняння в межах одного генотипу дало можливість встановити, що у хворих жінок із G/G-генотипом зріст був вищим ((163,3 ± 1,01) см проти (154,6 ± 1,36) см; $P < 0,001$), ніж у жінок із цим генотипом без цереброваскулярної патології. А в гетерозигот жіночої статі з IAT1 вищими виявилися зріст ((162,9 ± 0,85) см проти (155,6 ± 2,04) см; $P < 0,001$) та вага ((78,8 ± 2,24) кг проти (65,5 ± 2,51) кг; $P = 0,001$), якщо порівнювати з контрольною групою.

Таблиця 3.1.6 – Антропометричні показники в осіб різної статі у групах порівняння залежно від генотипу за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1*, (M ± m)

		Генотип			F	P ₁
		G/G	G/A	A/A		
<i>Жінки</i>						
Зріст, см	Контроль	154,6±1,36 (18)	155,6±2,04 (19)	161,1±4,32 (7)	1,674	0,200
	IAT1	163,3±1,01 (18)	162,9±0,85 (39)	164,7±1,79 (15)	1,491	0,232
	P ₂	< 0,001	< 0,001	0,368		
Маса тіла, кг	Контроль	71,3±3,01	65,5±2,51	77,3±2,62	3,023	0,060
	IAT1	77,4±2,17	78,8±2,24	74,7±2,44	0,611	0,546
	P ₂	0,109	0,001	0,525		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	29,9±1,39	27,1±0,95	30,1±1,68	1,836	0,172
	IAT1	29,0±0,76	29,7±0,83	27,3±1,03	1,506	0,229
	P ₂	0,573	0,062	0,154		
<i>Чоловіки</i>						
Зріст, см	Контроль	166,1±1,21 (36)	168,3±1,61 (29)	168,0±2,97 (14)	0,582	0,561
	IAT1	174,2±1,11 (31)	172,5±1,22 (40)	172,0±1,63 (27)	0,714	0,492
	P ₂	< 0,001	0,038	0,205		
Маса тіла, кг	Контроль	74,6±2,15	78,2±3,64	73,4±3,57	0,596	0,554
	IAT1	83,3±2,81	82,0±2,04	82,8±2,04	0,081	0,922
	P ₂	0,015	0,335	0,018		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	26,9±0,62	27,7±1,21	25,9±0,89	0,638	0,531
	IAT1	27,4±0,76	27,6±0,69	28,0±0,65	0,201	0,818
	P ₂	0,608	0,939	0,065		

Примітка. Див. табл. 3.1.5

Дослідження серед осіб чоловічої статі показало, що гомозиготи за основним алелем з IAT1 були вищими ((174,2 ± 1,11) см проти (166,1 ± 1,21) см; P < 0,001) та мали більшу вагу ((83,3 ± 2,81) кг проти (74,6 ± 2,15) кг; P = 0,015), ніж представники групи порівняння. У гетерозигот з ішемічним інсультом був більшим зріст ((172,5 ± 1,22) см проти (168,3 ± 1,61) см;

$P = 0,038$), а у гомозигот за мінорним алелем з інфарктом головного мозку – маса тіла ($(82,8 \pm 2,04)$ кг проти $(73,4 \pm 3,57)$ кг; $P = 0,018$), якщо порівнювати з відповідним контролем.

Після цього ми розподілили осіб обох груп на дві підгрупи, утворені залежно від показника ІМТ (< 25 кг/м² і ≥ 25 кг/м²). Останнє дозволило провести аналіз впливу поліморфізму G-1639A гена *VKORC1* на розвиток ішемічного інсульту в осіб із нормальною та надмірною вагою тіла (табл. 3.1.7).

Показано, що значуща різниця в розподілі різних генотипів за поліморфним сайтом G-1639A між хворими з ІАТІ та представниками контролю в осіб з ІМТ < 25 кг/м² була відсутньою ($P = 0,629$). Натомість у групі з ІМТ ≥ 25 кг/м² частота алельних варіантів за досліджуваним SNP між групами порівняння достовірно відрізнялася ($P = 0,025$).

Таблиця 3.1.7 – Розподіл генотипів за G-1639A поліморфізмом гена *VKORC1* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від показників ІМТ

Група	n	Генотип			P
		G/G (%) (95 % CI)	G/A (%) (95 % CI)	A/A (%) (95 % CI)	
ІМТ < 25 кг/м ²					
ІАТІ	41	10 (24,4) (11,3-37,5)	22 (53,7) (38,4-68,9)	9 (22,0) (9,3-34,6)	0,629
Контроль	38	13 (34,2) (19,1-49,3)	18 (47,4) (31,5-63,2)	7 (18,4) (6,1-30,8)	
ІМТ ≥ 25 кг/м ²					
ІАТІ	129	39 (30,2) (22,3-38,2)	57 (44,2) (35,6-52,8)	33 (25,6) (18,1-33,1)	0,025
Контроль	85	41 (48,2) (37,6-58,9)	30 (35,3) (25,1-45,5)	14 (16,5) (8,6-24,4)	

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за χ^2 -критерієм; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Аналіз за допомогою логістичної регресії в рамках чотирьох моделей успадкування не виявив статистично значущого зв'язку поліморфного локусу промотору гена *VKORC1* з розвитком інфаркту головного мозку в осіб із

нормальним ІМТ як до, так і після поправки на стать, вік, артеріальну гіпертензію та звичку палити (табл. 3.1.8).

Таблиця 3.1.8 – Аналіз зв’язку поліморфізму G-1639A гена VKORC1 з ІАТІ в осіб із нормальним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,339	1,612 (0,606–4,288)	0,519	1,521 (0,426–5,434)	14,98
Рецесивна	0,697	1,246 (0,413–3,758)	0,898	0,907 (0,203–4,062)	15,75
Наддомінантна	0,577	1,287 (0,531–3,116)	0,500	1,481 (0,474–4,625)	15,59
Аддитивна ^a	0,380	1,589 (0,565–4,465)	0,479	1,615 (0,428–6,086)	16,98
	0,434	1,671 (0,462–6,051)	0,801	1,252 (0,218–7,183)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2

Дослідження генотипної асоціації в підгрупі з підвищеним ІМТ дало можливість встановити, що в носіїв мінорного алеля (G/A- та A/A-генотипи) ризик розвитку ІАТІ був у 2,2 раза (CI = 1,219–3,793; $P_{\text{спост}} = 0,008$) вищий, ніж у гомозигот G/G (табл. 3.1.9). Після поправки на стать, вік, АГ та звичку палити достовірність результату зберігалася ($OR = 2,391$, CI = 1,180–4,843; $P_{\text{попр}} = 0,016$).

Таблиця 3.1.9 – Аналіз зв’язку поліморфізму G-1639A гена VKORC1 з ІАТІ в осіб із підвищеним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,008	2,150 (1,219–3,793)	0,016	2,391 (1,180–4,843)	18,11
Рецесивна	0,118	1,743 (0,869–3,498)	0,090	2,230 (0,882–5,638)	22,61
Наддомінантна	0,196	1,451 (0,825–2,552)	0,282	1,457 (0,734–2,892)	23,47
Аддитивна ^a	0,029	1,997 (1,072–3,723)	0,054	2,107 (0,989–4,489)	19,81
	0,020	2,478 (1,155–5,317)	0,021	3,304 (1,199–9,106)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2

Аналіз у рамках адитивної моделі засвідчив, що в осіб з G/A-генотипом ризик розвитку ішемічного інсульту вдвічі (CI = 1,072–3,723; $P_{\text{спост}} = 0,029$), а

в осіб з А/А-генотипом – у 2,5 раза ($CI = 1,155-5,317$; $P_{\text{спост}} = 0,020$) вищий, ніж у гомозигот за основним алелем. Після поправки на інші фактори ризику інсульту статистична значущість для гетерозигот втрачалася ($P_{\text{попр}} = 0,054$), проте зберігалася для гомозигот за мінорним алелем ($OR = 3,304$, $CI = 1,199-9,106$; $P_{\text{попр}} = 0,021$). Результати аналізу в межах інших моделей не були значущими. Найменший показник ІКА мала домінантна модель (18,11).

Аналіз за показниками артеріального тиску. У роботі було вивчено вплив поліморфізму G-1639A гена *VKORC1* на показники систолічного, діастолічного, пульсового та середнього артеріальних тисків у групах порівняння (табл. 3.1.10). Установлено, що значення наведених параметрів у представників дослідної та контрольної груп із різними генотипами за досліджуваним поліморфним сайтом достовірно не відрізнялися ($P > 0,05$).

Аналіз у межах окремих генотипів показав, що G/G-гомозиготи з ІАТІ мали більш високі значення $AT_{\text{діаст}}$ ($(94,9 \pm 2,2)$ мм рт. ст. проти $(87,0 \pm 1,5)$ мм рт. ст.; $P = 0,003$) та $AT_{\text{сер}}$ ($(118,0 \pm 2,8)$ мм рт. ст. проти $(110,5 \pm 1,9)$ мм рт. ст.; $P = 0,027$), ніж відповідні гомозиготи групи порівняння. У гетерозигот дослідної групи показники всіх видів тиску були значущо вищими ($AT_{\text{сист}}$ $(169,7 \pm 3,3)$ мм рт. ст. проти $(150,3 \pm 3,2)$ мм рт. ст. ($P < 0,001$); $AT_{\text{діаст}}$ $(96,4 \pm 1,7)$ мм рт. ст. проти $(87,7 \pm 1,6)$ мм рт. ст. ($P = 0,001$); $AT_{\text{пульс}}$ $(73,3 \pm 2,4)$ мм рт. ст. проти $(62,6 \pm 2,4)$ мм рт. ст. ($P = 0,004$); $AT_{\text{сер}}$ $(120,8 \pm 2,1)$ мм рт. ст. проти $(108,6 \pm 2,0)$ мм рт. ст. ($P < 0,001$)), ніж у представників групи контролю з генотипом G/A. У гомозигот за мінорним А-алелем вищими, ніж у групі порівняння, були значення $AT_{\text{сист}}$ ($(165,2 \pm 3,8)$ мм рт. ст. проти $(145,3 \pm 5,4)$ мм рт. ст.; $P = 0,004$), $AT_{\text{діаст}}$ ($(93,9 \pm 2,5)$ мм рт. ст. проти $(81,4 \pm 3,7)$ мм рт. ст.; $P = 0,007$) та $AT_{\text{сер}}$ ($(117,7 \pm 2,6)$ мм рт. ст. проти $(102,7 \pm 3,9)$ мм рт. ст.; $P = 0,002$).

Таблиця 3.1.10 – Показники артеріального тиску у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1*, (M ± m)

		Генотип			F	P ₁
		G/G	G/A	A/A		
АТ сист	Контроль	157,6±3,2 (53)	150,3±3,2 (48)	145,3±5,4 (20)	2,461	0,090
	IAT1	164,1±4,6 (49)	169,7±3,3 (79)	165,2±3,8 (42)	0,652	0,522
	P ₂	0,243	< 0,001	0,004		
АТ діаст	Контроль	87,0±1,5	87,7±1,6	81,4±3,7	2,032	0,136
	IAT1	94,9±2,2	96,4±1,7	93,9±2,5	0,369	0,692
	P ₂	0,003	0,001	0,007		
АТ пульс	Контроль	70,6±2,6	62,6±2,4	63,9±4,1	2,749	0,068
	IAT1	69,2±3,2	73,3±2,4	71,3±3,1	0,563	0,571
	P ₂	0,733	0,004	0,168		
АТ сер	Контроль	110,5±1,9	108,6±2,0	102,7±3,9	2,157	0,120
	IAT1	118,0±2,8	120,8±2,1	117,7±2,6	0,546	0,581
	P ₂	0,027	< 0,001	0,002		

Примітка. Див. табл. 3.1.5

Застосування однофакторного дисперсійного аналізу для вивчення впливу поліморфізму промотору гена *VKORC1* на показники артеріального тиску в осіб різної статі показало відсутність статистично значущих результатів як серед жінок, так і серед чоловіків групи порівняння ($P > 0,05$) (табл. 3.1.11).

Поряд із цим під час дослідження в підгрупах за генотипами було виявлено, що у гомозигот G/G жіночої статі з ішемічним інсультом значення АТ_{сист} ((179,4 ± 8,1) мм рт. ст. проти (151,9 ± 5,4) мм рт. ст.; $P = 0,008$), АТ_{діаст} ((100,8 ± 3,6) мм рт. ст. проти (86,1 ± 2,8) мм рт. ст.; $P = 0,003$) і АТ_{сер} ((127,1 ± 4,8) мм рт. ст. проти (108,1 ± 3,1) мм рт. ст.; $P = 0,002$) були вищими, ніж у відповідному контролі.

Таблиця 3.1.11 – Показники артеріального тиску в осіб різної статі в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1*, (M ± m)

		Генотип			F	P ₁
		G/G	G/A	A/A		
Жінки						
АТ сист	Контроль	151,9±5,4 (18)	149,2±4,9 (19)	139,3±11,3 (7)	0,741	0,483
	IAT1	179,4±8,1 (18)	170,1±4,9 (39)	170,7±6,5 (15)	0,613	0,545
	P ₂	0,008	0,010	0,018		
АТ діаст	Контроль	86,1±2,8	86,8±2,1	82,4±5,3	0,473	0,627
	IAT1	100,8±3,6	98,3±2,6	97,7±3,4	0,218	0,805
	P ₂	0,003	0,006	0,021		
АТ пульс	Контроль	65,8±5,1	62,4±3,8	57,1±7,5	0,533	0,591
	IAT1	78,6±6,1	71,8±3,3	73,0±5,2	0,607	0,548
	P ₂	0,117	0,089	0,098		
АТ сер	Контроль	108,1±3,1	107,6±2,8	101,2±6,9	0,714	0,496
	IAT1	127,1±4,8	122,3±3,1	122,0±4,0	0,443	0,644
	P ₂	0,002	0,004	0,012		
Чоловіки						
АТ сист	Контроль	160,4±3,9 (35)	151,0±4,4 (29)	148,5±5,8 (13)	1,927	0,153
	IAT1	155,2±5,1 (31)	169,3±4,5 (40)	162,2±4,7 (27)	2,314	0,104
	P ₂	0,415	0,006	0,091		
АТ діаст	Контроль	87,4±1,9	88,3±2,3	80,9±5,0	1,538	0,222
	IAT1	91,5±2,6	94,5±2,6	91,9±3,4	0,404	0,669
	P ₂	0,201	0,092	0,075		
АТ пульс	Контроль	73,0±2,9	62,8±3,1	67,5±4,8	2,935	0,059
	IAT1	63,7±3,4	74,8±3,5	70,3±4,0	2,492	0,088
	P ₂	0,040	0,017	0,677		
АТ сер	Контроль	111,8±2,4	109,2±2,8	103,4±4,8	1,451	0,241
	IAT1	112,7±3,2	119,4±2,8	115,3±3,4	1,287	0,281
	P ₂	0,820	0,015	0,052		

Примітка. Див. табл. 3.1.5

Жінки-гетерозиготи з ІАТІ також мали більш високі показники $AT_{\text{сист}}$ ((170,1 ± 4,9) мм рт. ст. проти (149,2 ± 4,9) мм рт. ст.; $P = 0,010$), $AT_{\text{діаст}}$ ((98,3 ± 2,6) мм рт. ст. проти (86,8 ± 2,1) мм рт. ст.; $P = 0,006$) та $AT_{\text{сер}}$ ((122,3 ± 3,1) мм рт. ст. проти (107,6 ± 2,8) мм рт. ст.; $P = 0,004$), ніж особи цієї самої статі без інсульту. У підгрупі за А/А-генотипом серед жінок картина результатів була схожою. В осіб дослідної групи були вищими показники $AT_{\text{сист}}$ ((170,7 ± 6,5) мм рт. ст. проти (139,3 ± 11,3) мм рт. ст.; $P = 0,018$), $AT_{\text{діаст}}$ ((97,7 ± 3,4) мм рт. ст. проти (82,4 ± 5,3) мм рт. ст.; $P = 0,021$) та $AT_{\text{сер}}$ ((122,0 ± 4,0) мм рт. ст. проти (101,2 ± 6,9) мм рт. ст.; $P = 0,012$), якщо порівнювати з відповідною контрольною групою.

Результати аналізу серед осіб чоловічої статі показали, що у гомозигот за основним алелем $AT_{\text{пульс}}$ був достовірно нижчим серед хворих з ІАТІ ((170,7 ± 6,5) мм рт. ст. проти (139,3 ± 11,3) мм рт. ст.; $P = 0,018$), ніж у групі порівняння. Натомість у гетерозигот чоловічої статі з ішемічним інсультом показники $AT_{\text{сист}}$ ((169,3 ± 4,5) мм рт. ст. проти (151,0 ± 4,4) мм рт. ст.; $P = 0,006$), $AT_{\text{пульс}}$ ((74,8 ± 3,5) мм рт. ст. проти (62,8 ± 3,1) мм рт. ст.; $P = 0,017$) і $AT_{\text{сер}}$ ((119,4 ± 2,8) мм рт. ст. проти (109,2 ± 2,8) мм рт. ст.; $P = 0,015$) мали вищі значення, ніж у відповідному контролі. Серед осіб чоловічої статі з А/А-генотипом значущої різниці в показниках артеріального тиску в групах порівняння виявлено не було ($P > 0,05$).

Наступним кроком аналізу був розподіл осіб обох груп порівняння на таких, які мали нормальний артеріальний тиск, і таких, які страждали на артеріальну гіпертензію ($AT_{\text{сист}} > 140$ мм рт. ст.; $AT_{\text{діаст}} > 90$ мм рт. ст.). В утворених підгрупах було проведено вивчення розподілу різних алельних варіантів за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* серед осіб з ІАТІ та без ознак цереброваскулярної патології (табл. 3.1.12). Показано, що різниця в розподілі генотипів за досліджуваним поліморфним сайтом була відсутньою в осіб із нормальним АТ ($P = 0,852$) і була статистично значущою у підгрупі з АГ ($P = 0,003$).

Таблиця 3.1.12 – Розподіл генотипів за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від показників АТ

Група	n	Генотип			P
		G/G (%) (95 % CI)	G/A (%) (95 % CI)	A/A (%) (95 % CI)	
Нормальний АТ					
ІАТІ	42	14 (33,3) (19,1-47,6)	19 (45,2) (30,2-60,3)	9 (21,5) (9,0-33,8)	0,852
Контроль	48	17 (35,4) (21,9-49,0)	19 (39,6) (25,8-53,4)	12 (25,0) (12,8-37,3)	
Підвищений АТ					
ІАТІ	128	35 (27,3) (19,6-35,1)	60 (46,9) (38,2-55,5)	33 (25,8) (18,2-33,4)	0,003
Контроль	73	36 (49,3) (37,9-60,8)	29 (39,7) (28,5-51,0)	8 (11,0) (3,8-18,1)	

Примітка. Див. табл. 3.1.7

Вивчення зв'язку G-1639A-поліморфного сайту гена *VKORC1* з ішемічним інсультом в осіб без артеріальної гіпертензії у рамках чотирьох основних моделей успадкування показало, що статистично значущі результати були відсутніми як без урахування інших факторів ризику атеросклерозу, так і після поправки на стать, вік, індекс маси тіла та звичку палити ($P > 0,05$) (табл. 3.1.13).

Таблиця 3.1.13 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб із нормальним АТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,836	1,097 (0,458–2,625)	0,228	1,966 (0,655–5,904)	15,77
Рецесивна	0,690	0,818 (0,306–2,191)	0,612	0,717 (0,199–2,588)	15,66
Наддомінантна	0,588	1,261 (0,545–2,918)	0,114	2,382 (0,811–6,997)	15,52
Аддитивна ^a	0,689	1,214 (0,469–3,143)	0,161	2,268 (0,722–7,123)	17,49
	0,870	0,911 (0,298–2,782)	0,725	0,778 (0,192–3,154)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2

Застосування бінарної логістичної регресії для аналізу в підгрупі з АГ дало змогу встановити, що в носіїв мінорного А-алеля за поліморфізмом

промотору гена *VKORC1* ризик розвитку ІАТІ був у 2,6 раза вищий (CI = 1,417–4,717; $P_{\text{спост}} = 0,002$), ніж у гомозигот G/G (табл. 3.1.14). Достовірність зазначених результатів зберігалася навіть після урахування статі, віку, ІМТ та звички палити (OR = 2,374, CI = 1,091–5,166; $P_{\text{попр}} = 0,029$).

Таблиця 3.1.14 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб із підвищеним АТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,002	2,585 (1,417–4,717)	0,029	2,374 (1,091–5,166)	19,72
Рецесивна	0,015	2,822 (1,255–6,501)	0,049	2,862 (1,003–8,169)	22,64
Наддомінантна	0,327	1,339 (0,747–2,399)	0,574	1,230 (0,598–2,528)	28,46
Адитивна ^a	0,021	2,128 (1,119–4,046)	0,095	2,042 (0,844–4,720)	19,26
	0,002	4,243 (1,722–10,453)	0,029	4,029 (1,153–14,077)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2.

Вивчення в рамках рецесивної моделі без поправки на фактори ризику атеросклерозу показало, що у гомозигот за мінорним алелем ризик настання ішемічного інсульту був у 2,8 раза вищим (CI = 1,255–6,501; $P_{\text{спост}} = 0,015$), ніж у носіїв основного G-алеля. Після включення в регресійне рівняння інших коваріат достовірність результатів залишалася значимою, а значення ризику практично не змінювалося (OR = 2,862, CI = 1,003–8,169; $P_{\text{попр}} = 0,049$). Під час аналізу в рамках адитивної моделі встановлено, що у гетерозигот ризик ІАТІ був у 2,1 (CI = 1,119–4,046; $P_{\text{спост}} = 0,021$), а у гомозигот A/A – у 4,2 (CI = 1,722–10,453; $P_{\text{спост}} = 0,002$) раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем. Проте після поправки на інші фактори ризику достовірність результатів зберігалася лише для гомозигот за мінорним алелем (OR = 4,029, CI = 1,153–14,077; $P_{\text{попр}} = 0,029$). Серед усіх моделей успадкування найменший показник інфор маційного критерію мала адитивна (ІКА = 19,26).

Аналіз за звичкою палити. Розподіл генотипів за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* у дослідних та контрольних осіб у підгрупах, утворених за наявністю звички палити наведений у таблиці 3.1.15. З'ясовано, що серед осіб, які не палять, частота різних алельних варіантів за досліджуваним SNP статистично значущо відрізняється, якщо проводити порівняння між пацієнтів з ІАТІ та представниками контрольної групи ($P = 0,009$). Натомість відмінності в такому розподілі серед курців виявлені не були ($P = 0,998$).

Таблиця 3.1.15 – Розподіл генотипів за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від звички палити

Група	n	Генотип			P
		G/G (%) (95 % CI)	G/A (%) (95 % CI)	A/A (%) (95 % CI)	
Не палять					
ІАТІ	120	36 (30,0) (21,8-38,2)	61 (50,8) (41,9-59,8)	23 (19,2) (12,1-26,2)	0,009
Контроль	93	46 (49,5) (39,3-59,6)	38 (40,8) (30,9-50,9)	9 (9,7) (3,7-15,7)	
Палять					
ІАТІ	50	13 (26,0) (13,8-38,2)	18 (36,0) (22,7-49,3)	19 (38,0) (24,6-51,5)	0,998
Контроль	31	8 (25,8) (10,4-41,2)	11 (35,5) (18,6-52,3)	12 (38,7) (21,6-55,9)	

Примітка. Див. табл. 3.1.7

Застосування регресійного аналізу для вивчення асоціації різних генотипів за поліморфним сайтом промотору гена *VKORC1* з розвитком ІАТІ серед осіб, які не мають звички палити, дозволило встановити таке (табл. 3.1.16). У рамках домінантної моделі з'ясовано, що в осіб із G/A- та A/A-генотипами ризик настання ішемічного інсульту був у 2,3 раза ($CI = 1,300-4,013$; $P_{\text{пост}} = 0,004$) вищим, ніж у гомозигот за основним алелем. Після урахування статі, віку, ІМТ та артеріальної гіпертензії достовірність результату зберігалася ($P_{\text{поп}} = 0,013$), а ризик незначно збільшувався ($OR = 2,412$, $CI = 1,206-4,824$).

Таблиця 3.1.16 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб, які не палять, з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,004	2,284 (1,300–4,013)	0,013	2,412 (1,206–4,824)	18,71
Рецесивна	0,059	2,213 (0,971–5,046)	0,071	2,629 (0,921–7,504)	23,25
Наддомінантна	0,149	1,496 (0,866–2,585)	0,219	1,522 (0,779–2,973)	24,99
Аддитивна ^a	0,018	2,051 (1,131–3,720)	0,043	2,122 (1,026–4,391)	19,57
	0,009	3,265 (1,347–7,916)	0,017	3,961 (1,283–12,231)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2

Статистично значущими виявилися результати після аналізу в рамках адитивної моделі успадкування ознаки. Так, до поправки на інші фактори ризику атеросклерозу імовірність ІАТІ у гетерозигот була у 2,1 раза (CI = 1,131–3,720; $P_{\text{спост}} = 0,018$), а у гомозигот за мінорним алелем – у 3,3 раза (CI = 1,347–7,916; $P_{\text{спост}} = 0,009$) вищою, ніж у носіїв генотипу G/G. Після мультиваріабельного регресійного аналізу значущість результатів лишалась достовірною. У носіїв G/A-генотипу ризик розвитку ішемічного інсульту становив 2,1 (CI = 1,026–4,391; $P_{\text{попр}} = 0,043$), у носіїв A/A-генотипу – 4,0 (CI = 1,283–12,231; $P_{\text{попр}} = 0,017$), якщо порівнювати з гомозиготами за основним алелем. Найменший показник критерію Акайке мала домінантна модель (ІКА = 18,71).

Під час аналізу зв'язку G-1639A-поліморфного варіанта гена *VKORC1* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту серед осіб, які палять, достовірних результатів у рамках жодної моделі успадкування виявлено не було як до, так і після залучення інших факторів ризику атеросклерозу ($P > 0,05$) (табл. 3.1.17). Парадоксальність того факту, що зв'язок поліморфізму G-1639A гена *VKORC1* з ІАТІ є відсутнім у курців та простежується в осіб, які не палять, можна пояснити тим, що паління є вагомим фактором ризику атеросклерозу та істотно підвищує ймовірність настання ішемічного атеротромботичного інсульту незалежно від генотипу за поліморфним сайтом промотору гена вітамін-К-епоксидредуктази. Натомість

аналіз серед осіб без цієї шкідливої звички дозволяє простежити вплив на розвиток інфаркту головного мозку саме генетичного чинника.

Таблиця 3.1.17 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена VKORC1 з ІАТІ в осіб, які палять, з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	P _{спост}	OR _{спост} (95 % CI)	P _{попр}	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,985	0,990 (0,356–2,754)	0,440	1,793 (0,407–7,893)	15,11
Рецесивна	0,949	1,096 (0,329–3,651)	0,881	1,096 (0,329–3,651)	15,09
Наддомінантна	0,962	1,023 (0,401–2,606)	0,618	1,365 (0,402–4,637)	15,09
Аддитивна ^a	0,991	1,007 (0,317–3,202)	0,443	1,929 (0,373–9,976)	17,09
	0,964	0,974 (0,312–3,044)	0,530	1,677 (0,334–8,418)	

Примітка. Див. табл. 3.1.2

Аналіз за показниками ліпідів плазми крові, коагулограми та глюкози. У таблиці 3.1.18 наведені відомості про концентрацію загального холестеролу, ліпопротеїнів високої, дуже низької та високої густини, тригліцеридів, глюкози натще у плазмі крові хворих з ІАТІ з різними генотипами за G-1639A-поліморфізмом гена VKORC1, а також подані такі показники їх коагулограми, як протромбіновий, тромбіновий час, фібриноген та спонтанний фібриноліз. Встановлено, що значущий вплив поліморфного варіанта промотору гена вітамін-К-епоксидредуктази на вміст ліпідів та глюкози крові був відсутнім. Проте під час аналізу показників коагулограми була виявлена достовірна різниця у значеннях тромбінового часу серед пацієнтів з різними генотипами за досліджуваним поліморфізмом ($F = 4,458$, $P = 0,013$). З метою порівняльного аналізу між пацієнтами з окремими генотипами була застосована поправка Бонфероні, що дозволило виявити достовірну різницю у показниках тромбінового часу між особами з G/A- та A/A-генотипами ($P = 0,010$) та відсутність такої між особами з G/G- і G/A- ($P = 0,687$) та G/G- і A/A- ($P = 0,293$) генотипами.

Таблиця 3.1.18 – Клінічна характеристика хворих з ІАТІ залежно від варіантів генотипу за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1*, (M ± m)

Показники	Генотип			F	P
	G/G (n = 47)	G/A (n = 70)	A/A (n = 40)		
Загальний ХС, ммоль/л ^a	5,09±0,21	5,02±0,18	5,06±0,25	0,040	0,961
ХС-ЛПНГ, ммоль/л ^a	3,29±0,21	3,24±0,16	3,24±0,24	0,021	0,979
ХС-ЛПДНГ, ммоль/л ^a	0,74±0,05	0,77±0,04	0,82±0,06	0,533	0,588
ХС-ЛПВГ, ммоль/л ^a	1,07±0,04	1,01±0,03	0,99±0,05	0,798	0,452
Тригліцериди, ммоль/л ^a	1,62±0,10	1,70±0,09	1,80±0,13	0,533	0,588
Індекс атерогенності ^a	4,62±0,53	4,75±0,39	5,06±0,59	0,177	0,838
Протромбіновий час, с	9,68±0,27	9,51±0,22	9,17±0,34	0,730	0,483
Тромбіновий час, с	16,5±0,46	17,2±0,46	15,3±0,39	4,458	0,013
Фібриноген, г/л	3,79±0,18	3,89±0,14	4,17±0,17	1,210	0,301
Спонтанний фібриноліз, хв	482,4±5,7	475,6±4,1	482,7±4,9	0,759	0,470
Глюкоза крові, ммоль/л	5,82±0,20	6,11±0,18	5,70±0,23	1,172	0,312

Примітка: n – кількість пацієнтів; ХС – холестерол; ЛПНГ – ліпопротеїни низької густини; ЛПДНГ – ліпопротеїни дуже низької густини; ЛПВГ – ліпопротеїни високої густини;

^a n = 47 для G/G-генотипу; n = 70 для G/A-генотипу та n = 40 для-A/A генотипу

Вплив на основні характеристики ІАТІ. Залежно від тяжкості клінічного перебігу ішемічного атеротромботичного інсульту усі хворі були поділені на три підгрупи: 1) із легким ступенем тяжкості; 2) із середнім ступенем тяжкості; 3) із тяжким перебігом. Результати порівняння розподілу генотипів за G-1639A-поліморфним локусом промотору гена *VKORC1* між пацієнтами з різним ступенем тяжкості ішемічного інсульту не виявили достовірної різниці (P = 0,695), що свідчило про відсутність впливу досліджуваного генетичного маркера на цю клінічну характеристику ІАТІ (табл. 3.1.19).

Таблиця 3.1.19 – Вплив G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* на тяжкість клінічного перебігу ІАТІ

Генотип	Ступінь тяжкості перебігу			P
	легкий	середньої тяжкості	тяжкий	
G/G	14 (25,5 %)	21 (31,8 %)	14 (28,6 %)	0,695
G/A	29 (52,7 %)	30 (45,5 %)	20 (40,8 %)	
A/A	12 (21,8 %)	15 (22,7 %)	15 (30,6 %)	
Разом	55 (100 %)	66 (100 %)	49 (100 %)	

Примітка. P – статистична значущість відмінностей за χ^2 -критерієм

Вивчення розподілу генотипів за поліморфним сайтом промотору гена *VKORC1* у хворих із первинним та повторним ішемічним інсультом показало, що в першій підгрупі співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот та гомозигот за мінорним алелем становило 27,6, 48,6 та 23,8 %, а в іншій підгрупі відповідно – 30,7, 43,1 і 26,2 %. Порівняння зазначених частот між хворими із первинним та повторним інсультом значущої різниці не виявило ($P = 0,783$) (рис. 3.1.4).

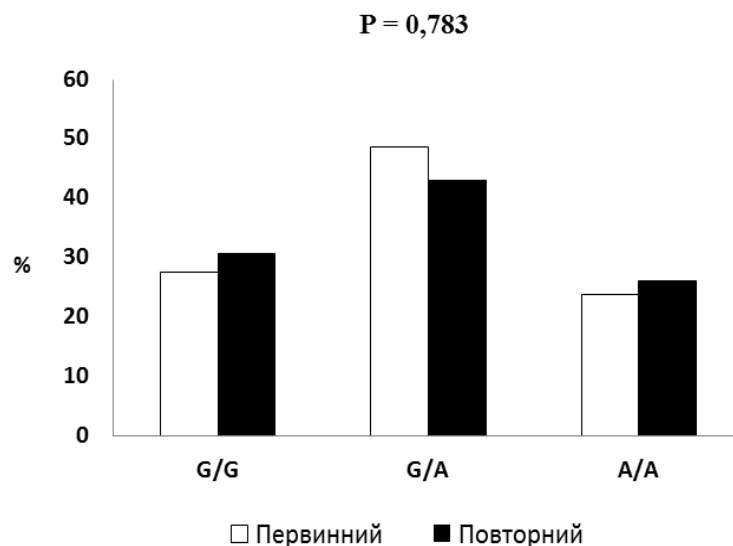


Рисунок 3.1.4 – Частота генотипів за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* у хворих із первинним (білі стовпчики) та повторним (чорні стовпчики) ішемічним інсультом. P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Підсумовуючи вищезазначене, можна зробити висновок, що існує асоціація між G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* та ішемічним атеротромботичним інсультом у представників української популяції. У носіїв мінорного A-алеля ризик розвитку ІАТІ значимо вищий, ніж у гомозигот за основним G-алелем. Зазначений ризик зростає в осіб жіночої статі, пацієнтів із надмірною вагою тіла, артеріальною гіпертензією та без звички палити. Також встановлено, що гомозиготи A/A мають значимо нижчі значення тромбінового часу, ніж гетерозиготи. Поряд із цим вплив досліджуваного поліморфного локусу на тяжкість та повторюваність ішемічного інсульту не виявлений.

3.2 Асоціація С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* із розвитком ішемічного інсульту атеротромботичного генезу

Суть однонуклеотидного поліморфізму С1173Т (rs9934438) полягає у заміні цитозину на тимін у ділянці першого інтрона гена *VKORC1* у положенні 1173.

У таблиці 3.2.1 наведено частоту основного (С) та мінорного (Т) алелів і наведено розподіл гомозигот за основним алелем (С/С), гетерозигот (С/Т) та гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) за С1173Т-поліморфізмом першого інтрона гена *VKORC1* у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та представників групи порівняння. Також показано, що частоти зазначених генотипів у контрольній та дослідній групах знаходились у відповідності до рівноваги Харді – Вайнберга ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2.1 – Частота алельних варіантів та алелів за поліморфізмом С1173Т гена *VKORC1* у контрольній групі й у хворих з ІАТІ

	Контрольна група	Хворі з ІАТІ
Гомозиготи С/С, n (%)	59 (47,6)	63 (37,1)
Гетерозиготи С/Т, n (%)	47 (37,9)	74 (43,5)
Гомозиготи Т/Т, n (%)	18 (14,5)	33 (19,4)
С-алель	0,67	0,59
Т-алель	0,33	0,41
χ^2	2,75	1,75
P	> 0,05	> 0,05

Примітка. n – кількість пацієнтів, χ^2 і P відображають відхилення у кожній групі від рівноваги Харді – Вайнберга

Порівняння частот алелів і трьох можливих варіантів генотипів, утворених за поліморфізмом С1173Т гена *VKORC1*, між пацієнтами з ІАТІ та представниками групи контролю подане на рис. 3.2.1. Виявлено, що характер

розподілу алелів та генотипних варіантів в осіб обох груп був схожим ($P = 0,057$ та $P = 0,178$ відповідно.).

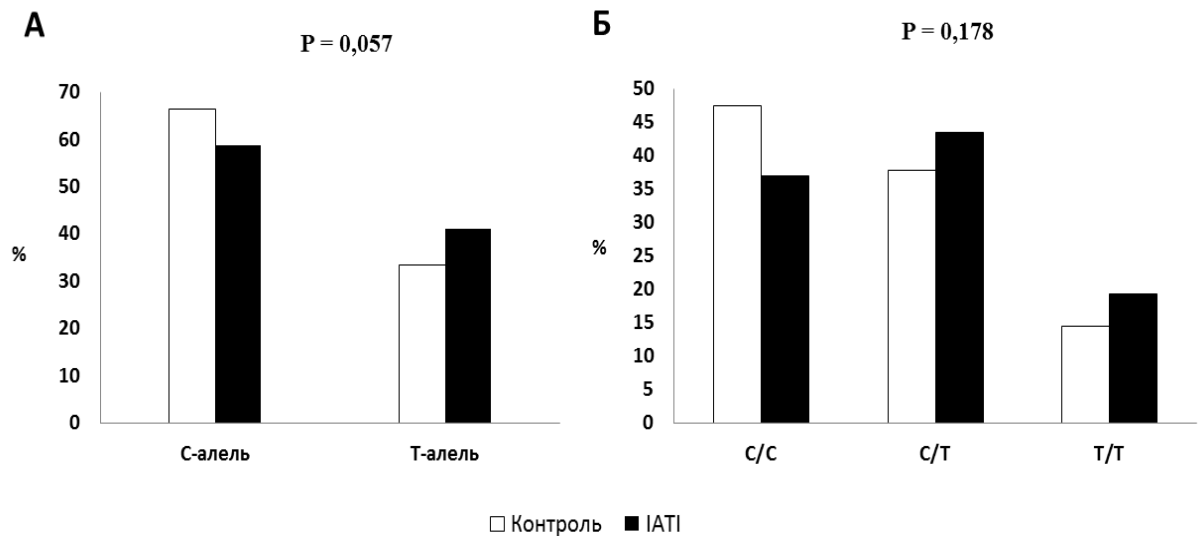


Рисунок 3.2.1 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Результати регресійного аналізу асоціації генотипів за С1173Т-поліморфним сайтом гена *VKORC1* з розвитком ішемічного інсульту в рамках домінантної, рецесивної, наддомінантної та адитивної моделей успадкування наведені в табл. 3.2.2.

Застосування бінарної логістичної регресії у межах жодної моделі не виявило достовірного зв'язку досліджуваного поліморфізму з розвитком ІАТІ ($P > 0,05$). Після поправки на вік, стать, ІМТ, звичку палити та артеріальну гіпертензію показник P під час аналізу в рамках домінантної ($P_{\text{попр}} = 0,054$) та супердомінантної ($P_{\text{попр}} = 0,055$) моделей максимально наближався до рівня статистичної значущості, проте не перетинав її. Найменший показник інформаційного критерію Акайке мала домінантна модель (ІКА = 18,96).

Таблиця 3.2.2 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,071	1,542 (0,963–2,467)	0,054	1,914 (0,989–3,449)	18,96
Рецесивна	0,275	1,418 (0,757–2,657)	0,701	1,165 (0,535–2,538)	21,00
Наддомінантна	0,333	1,263 (0,787–2,026)	0,055	1,811 (0,989–3,318)	21,28
Адитивна ^а	0,135	1,475 (0,886–2,455)	0,078	2,058 (0,912–3,926)	20,76
	0,117	1,717 (0,874–3,373)	0,260	1,620 (0,700–3,749)	

Примітка: 95 % CI – 95 % довірчий інтервал; ІКА – інформаційний критерій Акайке; $P_{\text{спост}}$ – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); $OR_{\text{спост}}$ – спостережуване відношення шансів; $P_{\text{попр}}$ – значення P після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ та АГ у загальній групі; поправки на вік, звичку палити, ІМТ та АГ у підгрупах за статтю; поправки на навік, стать, звичку палити та АГ у підгрупах за ІМТ; поправки на вік, стать, ІМТ та АГ у підгрупах за звичкою палити; $OR_{\text{попр}}$ – відношення шансів після поправки на коваріати.

^а Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння С/Т-генотипу з С/С-генотипом; другий рядок – порівняння Т/Т-генотипу з С/С-генотипом.

Аналіз за статтю. Під час аналізу окремо серед осіб жіночої статі було встановлено, що у хворих з ішемічним інсультом основний алель С зустрічався у 55,6 % випадків, а мінорний Т-алель – у 44,4 % (у групі порівняння це співвідношення становило 68,9 та 31,1% відповідно). Розподіл трьох можливих генотипів за С1173Т поліморфізмом гена *VKORC1* у жінок з ІАТІ становив 33,3, 44,4 та 22,2 %, а серед групи контролю – відповідно 48,9, 40,0 і 11,1 %. На рис. 3.2.2 наведені результати порівняння частот алелів та генотипів за досліджуваним поліморфним сайтом між жінками обох груп. Показано, що алель Т серед пацієток з ішемічним інсультом зустрічався достовірно частіше ($P = 0,042$), поряд з цим значущих відмінностей у розподілі генотипів виявлено не було ($P = 0,154$).

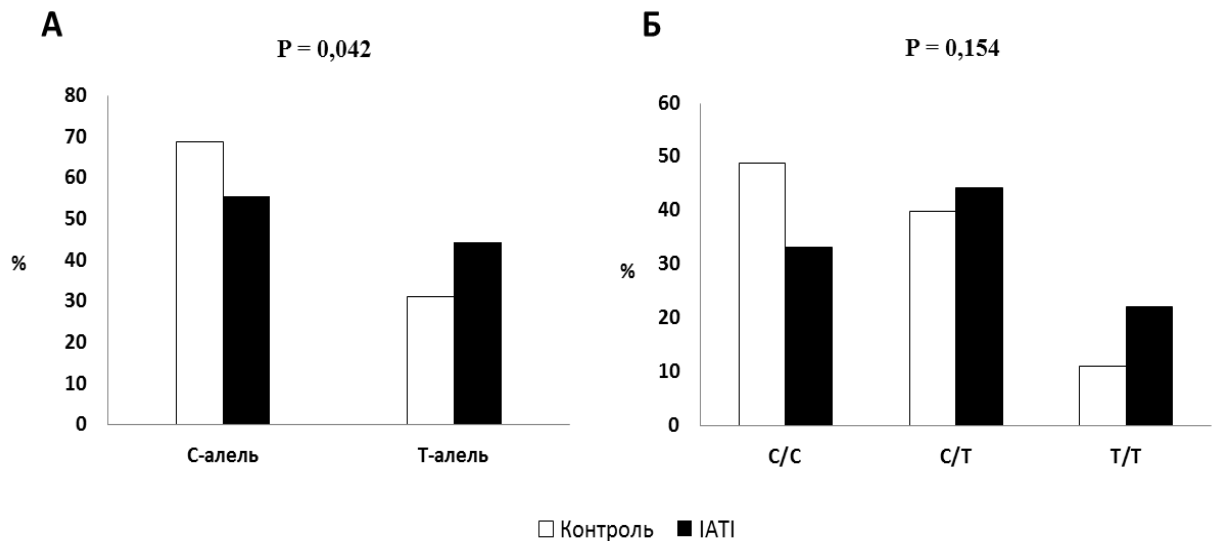


Рисунок 3.2.2 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у жінок з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

У табл. 3.2.3 подані результати поглибленого вивчення зв'язку між С1173Т SNP гена *VKORC1* та розвитком ІАТІ в осіб жіночої статі за допомогою методів логістичної регресії. Аналіз у рамках основних моделей успадкування не виявив асоціації зазначеного поліморфного локусу з ризиком настання ішемічного інсульту ($P > 0,05$). Такий зв'язок не був установлений і після урахування таких факторів ризику атеросклерозу, як вік, ІМТ, звичка палити та артеріальна гіпертензія ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2.3 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб жіночої статі з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,096	1,913 (0,892–4,102)	0,109	2,115 (0,846–5,286)	16,83
Рецесивна	0,135	2,286 (0,774–6,751)	0,243	2,162 (0,593–7,879)	17,17
Наддомінантна	0,637	1,200 (0,563–2,556)	0,454	1,427 (0,563–3,617)	19,41
Аддитивна ^а	0,242	1,630 (0,720–3,690)	0,217	1,869 (0,692–5,046)	17,79
	0,069	2,933 (0,921–9,347)	0,131	2,886 (0,730–11,413)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2

Результати рестрикційного аналізу окремо серед осіб чоловічої статі продемонстрували, що співвідношення дикого та мінорного алелів у хворих з ІАТІ становило 61,2 і 38,8 % відповідно (у групі контролю – 65,2 та 34,8 % відповідно). Частота гомозигот за основним алелем, гетерозигот та гомозигот за мінорним алелем у чоловіків групи дослідження становила 39,8, 42,9 та 17,3 % відповідно (у контролі – 46,8, 36,7, 16,5 %). Статистичне опрацювання зазначених даних дало змогу встановити, що розподіл алелів ($P = 0,442$) та генотипів ($P = 0,626$) за С1173Т-поліморфним сайтом гена *VKORC1* значущо не відрізняється між чоловіками з ІАТІ та без інфаркту головного мозку в анамнезі (рис. 3.2.3).

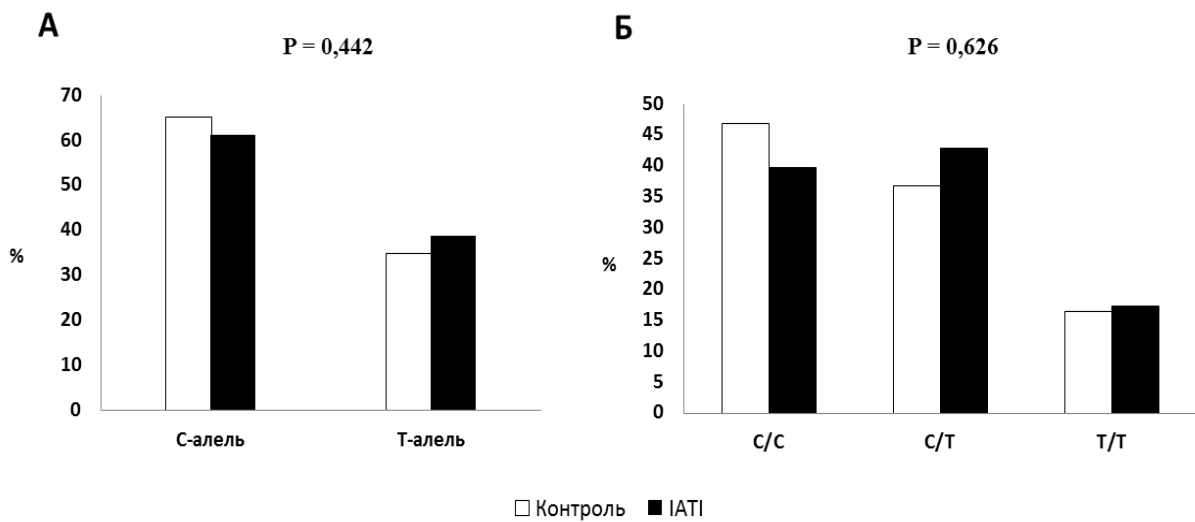


Рисунок 3.2.3 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у чоловіків з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Дослідження генотипної асоціації поліморфного локусу першого інтрона гена *VKORC1* з розвитком ІАТІ в осіб чоловічої статі виявило, що статистично достовірний зв'язок був відсутнім під час аналізу в кожній із чотирьох моделей успадкування ($P > 0,05$) (табл. 3.2.4). Аналіз за допомогою мультиваріабельної логістичної регресії також не встановив достовірного впливу досліджуваного генетичного маркера на розвиток ішемічного

інсульту в чоловіків ($P > 0,05$). Як і в жінок, найменше значення ІКА належало домінантній моделі успадкування ознаки (17,38).

Таблиця 3.2.4 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб чоловічої статі з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,347	1,333 (0,732–2,426)	0,165	1,744 (0,796–3,823)	17,38
Рецесивна	0,875	1,066 (0,483–2,352)	0,794	0,872 (0,311–2,444)	18,24
Наддомінантна	0,407	1,293 (0,704–2,375)	0,101	1,998 (0,874–4,569)	17,58
Адитивна ^a	0,340	1,374 (0,715–2,640)	0,099	2,091 (0,871–5,018)	19,33
	0,619	1,241 (0,530–2,905)	0,756	1,192 (0,394–3,602)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2

Аналіз за антропометричними даними. Генотипування осіб дослідної та контрольної груп за С1173Т-поліморфним сайтом гена *VKORC1* дало можливість провести визначення середніх значень показників зросту, маси тіла та ІМТ окремо у носіїв кожного генотипу та за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу провести порівняння (табл. 3.2.5). У результаті було встановлено, що існує статистично значущий вплив досліджуваного поліморфізму на показники зросту серед осіб контрольної групи (С/С – $(163,3 \pm 1,15)$ см; С/Т – $(161,1 \pm 1,45)$ см; Т/Т – $(168,5 \pm 2,90)$ см; $P = 0,026$). Апостеріорний тест Бонфероні встановив достовірну відмінність між С/Т- і Т/Т-генотипами ($P = 0,021$) та відсутність різниці між С/С- і С/Т- ($P = 0,728$) та С/С- і Т/Т- ($P = 0,154$) генотипами. Різниця в показниках маси тіла та ІМТ у носіїв різних генотипів за поліморфізмом першого інтрона гена *VKORC1* в контрольній групі була відсутньою ($P = 0,478$ та $P = 0,661$ відповідно). Серед пацієнтів з ІАТІ не виявлено впливу зазначеного SNP на показники зросту, ваги та індексу маси тіла ($P = 0,169$, $P = 0,532$ та $P = 0,961$ відповідно).

Порівняння антропометричних показників між контролем та дослідною групою показало, що у хворих із С/С-генотипом за С1173Т-поліморфним

сайтом гена *VKORC1* середні значення зросту ($(170,5 \pm 1,12)$ см проти $(163,3 \pm 1,15)$ см; $P < 0,001$) та маси тіла ($(81,9 \pm 1,91)$ кг проти $(73,1 \pm 1,64)$ кг; $P = 0,001$) були вищими, ніж в осіб без інфаркту головного мозку. Схожі результати були виявлені під час аналізу серед гетерозигот. Так, у носіїв С/Т-генотипу з ІАТІ вищими були показники зросту ($(167,9 \pm 0,89)$ см проти $(161,1 \pm 1,45)$ см; $P < 0,001$) та маси тіла ($(79,8 \pm 1,36)$ кг проти $(72,6 \pm 1,79)$ кг; $P = 0,002$), якщо порівнювати з гетерозиготами контролю. Відмінностей у середніх значеннях вищенаведених показників серед гомозигот за мінорним алелем виявлено не було ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2.5 – Антропометричні показники у дослідній та контрольній групах залежно від генотипу за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1*, ($M \pm m$)

		Генотип			F	P ₁
		C/C	C/T	T/T		
Зріст, см	Контроль	163,3±1,15 (59)	161,1±1,45 (46)	168,5±2,90 (18)	3,749	0,026
	ІАТІ	170,5±1,12 (63)	167,9±0,89 (74)	168,3±1,27 (33)	1,795	0,169
	P ₂	< 0,001	< 0,001	0,942		
Маса тіла, кг	Контроль	73,1±1,64	72,6±1,79	77,4±5,78	0,744	0,478
	ІАТІ	81,9±1,91	79,8±1,36	79,2±1,89	0,633	0,532
	P ₂	0,001	0,002	0,719		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	27,4±0,54	28,2±0,75	27,1±1,68	0,415	0,661
	ІАТІ	28,2±0,63	28,3±0,44	28,1±0,71	0,040	0,961
	P ₂	0,340	0,902	0,526		

Примітка: F – критерій Фішера; P₁ і P₂ – значущість відмінностей між генотипами за даними однофакторного дисперсійного аналізу (P₁) й між контролем та ІАТІ за t-критерієм Стьюдента (P₂). У дужках – кількість пацієнтів

Дослідження впливу С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* на антропометричні показники окремо в осіб різної статі виявило, що у жінок контрольної групи існує залежність середніх значень зросту від генотипу за зазначеним SNP ((C/C – $(156,9 \pm 1,42)$ см; C/T – $(152,1 \pm 1,54)$ см; T/T –

($165,8 \pm 5,72$) см; $P = 0,003$) (табл. 3.2.6). Результати застосування корекції Бонфероні показали, що існує достовірна відмінність між С/Т- і Т/Т-генотипами ($P = 0,002$). Натомість різниця між С/С- і С/Т- ($P = 0,161$) та С/С- і Т/Т- ($P = 0,057$) генотипами є незначимою. Вплив С1173Т-поліморфізму на показники маси тіла та ІМТ у жінок контрольної групи та на всі антропометричні показники жінок з ішемічним інсультом виявлений не був ($P > 0,05$). Аналіз залежності показників зросту, ваги та індексу маси тіла від С1173Т-поліморфного локусу гена *VKORC1* в осіб чоловічої статі показав відсутність впливу цього генетичного маркера на наведені показники як у хворих з ІАТІ, так і в осіб групи контролю ($P > 0,05$).

Результати порівняння в межах одного генотипу продемонстрували, що у пацієток із С/С-генотипом зріст був вищим ($163,9 \pm 1,51$) см проти ($156,9 \pm 1,42$) см; $P = 0,002$), ніж у відповідних гомозигот контрольної групи. У носіїв С/Т-генотипу з ІАТІ вищими були зріст ($162,9 \pm 0,80$) см проти ($152,1 \pm 1,54$) см; $P < 0,001$) та маса тіла ($77,7 \pm 2,17$) кг проти ($69,1 \pm 2,64$) кг; $P = 0,019$), якщо порівнювати з відповідним контролем. У жінок із Т/Т-генотипом відмінності в антропометричних показниках між групами порівняння виявлені не були ($P > 0,05$).

Аналізом серед представників чоловічої статі було встановлено, що носії С/С-генотипу із ІАТІ мали вищі значення показників зросту ($174,5 \pm 1,16$) см проти ($167,2 \pm 1,26$) см; $P < 0,001$) та маси тіла ($85,4 \pm 2,48$) кг проти ($75,5 \pm 2,09$) кг; $P = 0,003$), якщо порівнювати із контролем. У гетерозигот з ішемічним інсультом зріст ($171,8 \pm 1,13$) см проти ($166,3 \pm 1,38$) см; $P = 0,003$) та вага ($81,5 \pm 1,71$) кг проти ($74,7 \pm 2,32$) кг; $P = 0,019$) були більшими, ніж у чоловіків із С/Т-генотипом контрольної групи. У гомозигот за мінорним алелем чоловічої статі різниця в показниках зросту, маси тіла та ІМТ між групами порівняння була відсутньою ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2.6 – Антропометричні показники в осіб різної статі у групах порівняння залежно від генотипу за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1*, ($M \pm m$)

		Генотип			F	P ₁
		C/C	C/T	T/T		
Жінки						
Зріст, см	Контроль	156,9±1,42 (22)	152,1±1,54 (17)	165,8±5,72 (5)	6,885	0,003
	IAT1	163,9±1,51 (24)	162,9±0,80 (32)	164,6±0,98 (16)	0,557	0,576
	P ₂	0,002	< 0,001	0,735		
Маса тіла, кг	Контроль	69,1±2,49	69,1±2,64	74,8±7,92	0,491	0,615
	IAT1	76,3±2,63	77,7±2,17	79,5±2,67	0,334	0,717
	P ₂	0,054	0,019	0,472		
ІМТ ₂ кг/м ²	Контроль	28,1±0,98	29,9±1,22	27,4±3,32	0,835	0,441
	IAT1	28,5±1,07	29,3±0,76	29,4±1,07	0,255	0,775
	P ₂	0,785	0,663	0,454		
Чоловіки						
Зріст, см	Контроль	167,2±1,26 (37)	166,3±1,38 (29)	169,5±3,46 (13)	0,644	0,528
	IAT1	174,5±1,16 (39)	171,8±1,13 (42)	171,8±1,97 (17)	1,540	0,220
	P ₂	< 0,001	0,003	0,546		
Маса тіла, кг	Контроль	75,5±2,09	74,7±2,32	78,5±7,56	0,259	0,773
	IAT1	85,4±2,48	81,5±1,71	79,0±2,76	1,679	0,192
	P ₂	0,003	0,019	0,946		
ІМТ ₂ кг/м ²	Контроль	27,0±0,64	27,1±0,90	26,9±2,02	0,004	0,996
	IAT1	28,1±0,79	27,6±0,51	26,8±0,83	0,643	0,528
	P ₂	0,286	0,607	0,960		

Примітка. Див. табл. 3.2.5

Розподіл представників обох груп на підгрупи, утворені залежно від показника ІМТ ($< 25 \text{ кг/м}^2$ і $\geq 25 \text{ кг/м}^2$), дозволив визначити частоту, з якою зустрічаються різні алельні варіанти за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* в осіб з нормальною та надмірною вагою тіла (табл. 3.2.7). Встановлено, що достовірна різниця в розподілі генотипів за наведеним поліморфним сайтом

між хворими з ішемічним інсультом та представниками контролю була відсутньою як в осіб з ІМТ < 25 кг/м² (P = 0,568), так і в підгрупі з ІМТ ≥ 25 кг/м² (P = 0,212).

Таблиця 3.2.7 – Розподіл генотипів за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від показників ІМТ

Група	n	Генотип			P
		C/C (%) (95 % CI)	C/T (%) (95 % CI)	T/T (%) (95 % CI)	
ІМТ < 25 кг/м ²					
ІАТІ	41	16 (39,0) (24,1-54,0)	16 (39,0) (24,1-54,0)	9 (22,0) (9,3-34,6)	0,568
Контроль	38	19 (50,0) (34,1-65,9)	11 (28,9) (14,5-43,4)	8 (21,1) (8,1-34,0)	
ІМТ ≥ 25 кг/м ²					
ІАТІ	129	47 (36,4) (28,1-44,8)	58 (45,0) (36,4-53,6)	24 (18,6) (11,9-25,3)	0,212
Контроль	85	40 (47,1) (36,5-57,7)	35 (41,2) (30,7-51,6)	10 (11,8) (4,9-18,6)	

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за χ^2 -критерієм; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Поглибленим аналізом із використанням методів логістичної регресії в межах чотирьох моделей успадкування не було встановлено достовірної асоціації поліморфного сайту першого інтрона гена *VKORC1* з розвитком ІАТІ в осіб із нормальною вагою (ІМТ < 25 кг/м²) як до, так і після урахування віку, статі пацієнта, наявності в нього звички палити та артеріальної гіпертензії (табл. 3.2.8).

Вивчення зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб із підвищеним ІМТ також не виявило достовірної асоціації під час аналізу за допомогою бінарної та мультivarіабельної логістичної регресії (табл. 3.2.9).

Таблиця 3.2.8 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб із нормальним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,328	1,562 (0,639–3,818)	0,496	1,476 (0,481–4,527)	15,23
Рецесивна	0,923	1,055 (0,360–3,089)	0,536	0,637 (0,153–2,655)	16,18
Наддомінантна	0,347	1,571 (0,613–4,025)	0,208	2,213 (0,642–7,626)	15,30
Адитивна ^а	0,292	1,727 (0,626–4,769)	0,260	2,112 (0,575–7,763)	17,06
	0,625	1,336 (0,418–4,268)	0,820	0,839 (0,184–3,830)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2

Таблиця 3.2.9 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб із підвищеним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,122	1,551 (0,889–2,706)	0,053	2,142 (0,974–4,310)	18,40
Рецесивна	0,184	1,714 (0,774–3,796)	0,346	1,598 (0,603–4,236)	18,94
Наддомінантна	0,585	1,167 (0,671–2,031)	0,141	1,683 (0,842–3,367)	20,50
Адитивна ^а	0,257	1,410 (0,778–2,556)	0,054	2,085 (0,989–4,397)	19,65
	0,099	2,043 (0,873–4,777)	0,118	2,322 (0,806–6,868)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2

Аналіз за показниками артеріального тиску. Результати вивчення впливу С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* на показники різних видів артеріального тиску наведені у табл. 3.2.10. З'ясовано, що існує зв'язок між зазначеним однонуклеотидним поліморфізмом та значеннями АТ_{діаст} в осіб контрольної групи ((С/С – $(88,2 \pm 1,5)$ мм рт. ст.; С/Т – $(87,1 \pm 1,9)$ мм рт. ст.; Т/Т – $(78,7 \pm 3,1)$ мм рт. ст.; $P = 0,015$). Апостеріорний тест Бонфероні виявив достовірну відмінність між С/С- і Т/Т- ($P = 0,013$) та С/Т- і Т/Т- ($P = 0,044$) генотипами. Натомість між С/С- та С/Т-генотипами різниці в показниках діастолічного тиску не було ($P = 0,999$). На середні значення АТ_{сист}, АТ_{пульс} та АТ_{сер} в контрольній групі, а також на всі види артеріального тиску серед пацієнтів з ІАТІ поліморфний сайт С1173Т впливу не мав ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2.10 – Показники артеріального тиску у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за поліморфізмом С1173Т гена *VKORC1*, (М ± m)

		C/C	C/T	T/T	F	P ₁
АТ сист	Контроль	155,3±3,0 (59)	150,7±3,7 (44)	148,9±5,2 (18)	0,751	0,474
	IАТІ	166,6±3,6 (63)	167,6±3,8 (74)	166,4±3,9 (33)	0,028	0,973
	P ₂	0,018	0,004	0,010		
АТ діаст	Контроль	88,2±1,5	87,1±1,9	78,7±3,1	4,348	0,015
	IАТІ	94,1±1,8	96,6±2,1	95,0±2,0	0,420	0,657
	P ₂	0,014	0,003	< 0,001		
АТ пульс	Контроль	67,1±2,3	63,7±2,8	70,2±4,2	0,955	0,388
	IАТІ	72,5±2,8	71,0±2,7	71,3±2,8	0,080	0,923
	P ₂	0,142	0,079	0,823		
АТ сер	Контроль	110,5±1,8	108,3±2,3	102,1±3,4	2,352	0,100
	IАТІ	118,3±2,2	120,2±2,5	118,9±2,5	0,196	0,822
	P ₂	0,007	0,002	< 0,001		

Примітка. Див. табл. 3.2.5

Дослідження в підгрупах за окремими генотипами дало можливість установити, що у гомозигот за основним алелем вищі значення АТ_{сист} ((166,6 ± 3,6) мм рт. ст. проти (155,3 ± 3,0) мм рт. ст.; P = 0,018), АТ_{діаст} ((94,1 ± 1,8) мм рт. ст. проти (88,2 ± 1,5) мм рт. ст.; P = 0,014) та АТ_{сер} ((118,3 ± 2,2) мм рт. ст. проти (110,5 ± 1,8) мм рт. ст.; P = 0,007) спостерігалися у хворих з ІАТІ, якщо порівнювати з відповідним контролем. Схожа картина виявилася під час аналізу в підгрупах, утворених за С/Т- і Т/Т-генотипами. Так, у гетерозигот з ішемічним інсультом вищими, ніж у контролі, були значення АТ_{сист} ((167,6 ± 3,8) мм рт. ст. проти (150,7 ± 3,7) мм рт. ст.; P = 0,004), АТ_{діаст} ((96,6 ± 2,1) мм рт. ст. проти (87,1 ± 1,9) мм рт. ст.; P = 0,003) та АТ_{сер} ((120,2 ± 2,5) мм рт. ст. проти (108,3 ± 2,3) мм рт. ст.; P = 0,002). У гомозигот Т/Т з ІАТІ вищими, ніж у групі порівняння, спостерігалися показники АТ_{сист} ((166,4 ± 3,9) мм рт. ст. проти

($148,9 \pm 5,2$) мм рт. ст.; $P = 0,010$), $AT_{\text{діаст}}$ ($95,0 \pm 2,0$) мм рт. ст. проти ($78,7 \pm 3,1$) мм рт. ст.; $P < 0,001$) та $AT_{\text{сер}}$ ($118,9 \pm 2,5$) мм рт. ст. проти ($102,1 \pm 3,4$) мм рт. ст.; $P < 0,001$).

Розрахований за допомогою дисперсійного аналізу критерій Фішера під час дослідження впливу С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* на різні види артеріального тиску окремо серед жінок та чоловіків не дозволив виявити значущих результатів в обох групах порівняння ($P > 0,05$) (табл. 3.2.11).

При цьому аналіз серед осіб жіночої статі в межах окремих генотипів за С1173Т-поліморфним сайтом продемонстрував, що в С/С-гомозигот з ІАТІ були вищими показники $AT_{\text{сист}}$ ($172,3 \pm 6,2$) мм рт. ст. проти ($150,2 \pm 5,9$) мм рт. ст.; $P = 0,014$), $AT_{\text{діаст}}$ ($97,7 \pm 2,9$) мм рт. ст. проти ($86,6 \pm 2,5$) мм рт. ст.; $P = 0,006$) і $AT_{\text{сер}}$ ($122,6 \pm 3,7$) мм рт. ст. проти ($107,8 \pm 3,4$) мм рт. ст.; $P = 0,005$), ніж у відповідному контролі. Хворі жінки з С/Т-генотипом також мали більш високі показники $AT_{\text{сист}}$ ($176,6 \pm 5,8$) мм рт. ст. проти ($147,1 \pm 4,0$) мм рт. ст.; $P = 0,001$), $AT_{\text{діаст}}$ ($102,7 \pm 2,8$) мм рт. ст. проти ($85,9 \pm 2,6$) мм рт. ст.; $P < 0,001$) та $AT_{\text{сер}}$ ($127,3 \pm 3,6$) мм рт. ст. проти ($106,3 \pm 2,5$) мм рт. ст.; $P < 0,001$), ніж особи жіночої статі без інфаркту головного мозку. У гомозигот за мінорним алелем статистично значущої різниці в показниках артеріальних тисків між групами порівняння виявлено не було ($P > 0,05$).

Під час аналізу серед чоловіків значущі результати спостерігались лише у підгрупі за Т/Т-генотипом. Так, гомозиготи за мінорним алелем з ІАТІ мали вищі значення $AT_{\text{сист}}$ ($167,7 \pm 5,1$) мм рт. ст. проти ($149,2 \pm 6,0$) мм рт. ст.; $P = 0,026$), $AT_{\text{діаст}}$ ($97,1 \pm 2,5$) мм рт. ст. проти ($77,5 \pm 3,9$) мм рт. ст.; $P < 0,001$) та $AT_{\text{сер}}$ ($120,6 \pm 3,2$) мм рт. ст. проти ($101,4 \pm 4,1$) мм рт. ст.; $P = 0,001$), ніж у відповідному контролі.

Таблиця 3.2.11 – Показники артеріального тиску в осіб різної статі в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1*, (M ± m)

		Генотип			F	P ₁
		C/C	C/T	T/T		
Жінки						
АТ сист	Контроль	150,2±5,9 (22)	147,1±4,0 (17)	148,0±11,6 (5)	0,088	0,916
	IAT1	172,3±6,2 (24)	176,6±5,8 (32)	165,0±6,2 (16)	0,774	0,465
	P ₂	0,014	0,001	0,201		
АТ діаст	Контроль	86,6±2,5	85,9±2,6	82,0±3,7	0,349	0,708
	IAT1	97,7±2,9	102,7±2,8	92,8±3,2	2,447	0,094
	P ₂	0,006	< 0,001	0,095		
АТ пульс	Контроль	63,6±4,5	61,2±4,2	66,0±8,1	0,147	0,863
	IAT1	74,6±4,7	73,9±4,1	72,2±4,2	0,058	0,944
	P ₂	0,099	0,054	0,487		
АТ сер	Контроль	107,8±3,4	106,3±2,5	104,0±6,3	0,175	0,840
	IAT1	122,6±3,7	127,3±3,6	116,9±3,9	1,707	0,189
	P ₂	0,005	< 0,001	0,116		
Чоловіки						
АТ сист	Контроль	158,2±3,3 (37)	152,9±5,4 (27)	149,2±6,0 (13)	0,856	0,429
	IAT1	163,1±4,4 (39)	160,7±4,7 (42)	167,7±5,1 (17)	0,374	0,689
	P ₂	0,378	0,288	0,026		
АТ діаст	Контроль	89,1±1,8	87,8±2,6	77,5±3,9	4,222	0,018
	IAT1	91,9±2,1	91,9±2,9	97,1±2,5	0,772	0,465
	P ₂	0,317	0,330	< 0,001		
АТ пульс	Контроль	69,2±2,5	65,2±3,8	71,8±4,9	0,742	0,479
	IAT1	71,2±3,4	68,8±3,6	70,6±3,7	0,130	0,878
	P ₂	0,639	0,509	0,843		
АТ сер	Контроль	112,1±2,1	109,5±3,3	101,4±4,1	2,509	0,088
	IAT1	115,6±2,7	114,8±3,2	120,6±3,2	0,648	0,525
	P ₂	0,313	0,273	0,001		

Примітка. Див. табл. 3.2.5

Розподіл гомозигот за основним алелем, гетерозигот та гомозигот за мінорним алелем за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* в осіб із нормальним артеріальним тиском та артеріальною гіпертензією поданий у табл. 3.2.12. Порівняння зазначеного розподілу між пацієнтами з ІАТІ та особами без інфаркту головного мозку не виявило значущої різниці як у підгрупі з нормальним АТ ($P = 0,725$), так і серед осіб з АГ ($P = 0,140$).

Таблиця 3.2.12 – Розподіл генотипів за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від показників АТ

Група	n	Генотип			P
		С/С (%) (95 % CI)	С/Т (%) (95 % CI)	Т/Т (%) (95 % CI)	
Нормальний АТ					
ІАТІ	42	16 (38,1) (23,4-52,8)	19 (45,2) (30,2-60,3)	7 (16,7) (5,4-27,9)	0,725
Контроль	48	22 (45,8) (31,7-59,9)	18 (37,5) (23,8-51,2)	8 (16,7) (6,1-27,2)	
Підвищений АТ					
ІАТІ	128	47(36,7) (28,4-45,1)	55 (43,0) (34,4-51,5)	26 (20,3) (13,3-27,3)	0,140
Контроль	73	37 (50,7) (39,2-62,2)	26 (35,6) (24,6-46,6)	10 (13,7) (5,8-21,6)	

Примітка. Див. табл. 3.2.7

Аналіз асоціації С1173Т-поліморфного локусу гена *VKORC1* з розвитком ІАТІ в осіб із нормальним АТ у рамках домінантної, рецесивної, адитивної та супердомінантної моделей успадкування ознаки не виявив достовірного зв'язку як до поправки на стать, вік, ІМТ і звичку палити, так і після неї ($P > 0,05$) (табл. 3.2.13).

У табл. 3.2.14 наведені результати вивчення зв'язку поліморфізму С1173Т гена *VKORC1* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в рамках чотирьох моделей успадкування серед осіб з артеріальною гіпертензією. Аналіз за допомогою бінарної логістичної регресії не встановив асоціації зазначеного SNP із розвитком ІАТІ ($P > 0,05$). Після урахування

інших факторів ризику атеросклерозу статистично значущого зв'язку виявлено також не було ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2.13 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб із нормальним АТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,459	1,375 (0,592–3,194)	0,295	1,730 (0,620–4,828)	15,44
Рецесивна	1,000	1,000 (0,329–3,038)	0,628	0,701 (0,166–2,955)	15,99
Наддомінантна	0,457	1,377 (0,593–3,199)	0,157	2,167 (0,743–6,318)	15,43
Аддитивна ^a	0,423	1,451 (0,584–3,610)	0,181	2,157 (0,700–6,648)	17,34
	0,763	1,203 (0,362–4,001)	0,978	0,978 (0,209–4,584)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2

Таблиця 3.2.14 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб із підвищеним АТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,055	1,771 (0,989–3,173)	0,071	1,960 (0,944–4,066)	17,64
Рецесивна	0,242	1,606 (0,726–3,553)	0,362	1,571 (0,594–4,152)	19,93
Наддомінантна	0,307	1,362 (0,753–2,465)	0,246	1,558 (0,736–3,299)	20,31
Аддитивна ^a	0,115	1,665 (0,883–3,142)	0,116	1,901 (0,853–4,236)	19,42
	0,097	2,047 (0,877–4,775)	0,164	2,097 (0,740–5,946)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2.

Аналіз за звичкою палити. Частоти різних алельних варіантів за поліморфізмом С1173Т гена *VKORC1* у групах порівняння після розподілу їх на тих, які палять, та тих, які не мають цієї шкідливої звички, наведені у табл. 3.2.15. Достовірної різниці в розподілі С/С-, С/Т- і Т/Т- генотипів між хворими з ІАТІ та особами без інсульту в осіб, які не палять ($P = 0,134$), та в курців ($P = 0,191$) виявлено не було.

Таблиця 3.2.15 – Розподіл генотипів за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від звички палити

Група	n	Генотип			P
		C/C (%) (95 % CI)	C/T (%) (95 % CI)	T/T (%) (95 % CI)	
Не палять					
ІАТІ	120	45 (37,5) (28,8-46,2)	51 (42,5) (33,7-51,3)	24 (20,0) (12,8-27,2)	0,134
Контроль	93	44 (47,3) (37,2-57,5)	39 (41,9) (31,9-52,0)	10 (10,8) (4,5-17,1)	
Палять					
ІАТІ	50	18 (36,0) (22,7-49,3)	23 (46,0) (32,2-59,8)	9 (18,0) (7,4-28,7)	0,191
Контроль	31	15 (48,4) (30,8-66,0)	8 (25,8) (10,4-41,2)	8 (25,8) (10,4-41,2)	

Примітка. Див. табл. 3.2.7

Поглиблене вивчення зв'язку поліморфізму першого інтрона гена *VKORC1* з розвитком ішемічного інсульту в осіб без звички палити за допомогою бінарної логістичної регресії дало можливість встановити, що у гомозигот за мінорним алелем ризик настання ІАТІ у 2,4 раза ($CI = 1,006-5,472$; $P_{\text{спост}} = 0,048$) вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (табл. 3.2.16). Однак після урахування віку, статі, ІМТ пацієнта та наявності в нього артеріальної гіпертензії статистична значущість наведених результатів втрачалася ($P_{\text{попр}} = 0,133$).

Таблиця 3.2.16 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб, які не палять, з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,151	1,497 (0,864–2,593)	0,081	1,824 (0,929–3,582)	19,75
Рецесивна	0,072	2,075 (0,938–4,591)	0,273	1,703 (0,658–4,409)	18,37
Наддомінантна	0,934	1,023 (0,591–1,771)	0,323	1,414 (0,711–2,809)	21,81
Адитивна ^a	0,413	1,279 (0,710–2,303)	0,152	1,706 (0,822–3,539)	19,70
	0,048	2,347 (1,006–5,472)	0,133	2,180 (0,790–6,016)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2

Результати дослідження асоціації С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з розвитком ІАТІ у курців у рамках чотирьох моделей успадкування наведені в табл. 3.2.17. З'ясовано, що досліджуваний поліморфний сайт не впливає на ризик настання інфаркту головного мозку, якщо проводити аналіз без урахування інших факторів ризику атеросклерозу ($P > 0,05$). Після поправки на стать, вік, ІМТ та АГ значення P , визначене в рамках наддомінантної моделі, наближалось до межі статистичної значущості ($P_{\text{попр}} = 0,052$), проте не перетинало її. Таким чином, зв'язку поліморфного сайту С1173Т гена *VKORC1* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в курців виявлено не було і після урахування інших факторів ризику ($P > 0,05$). Найменше значення критерію Акайке мала наддомінантна модель (ІКА = 14,92).

Таблиця 3.2.17 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ в осіб, які палять, з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,272	1,667 (0,670–4,144)	0,210	2,194 (0,642–7,497)	17,10
Рецесивна	0,404	0,631 (0,214–1,860)	0,325	0,460 (0,098–2,162)	17,62
Наддомінантна	0,073	2,449 (0,921–6,512)	0,052	4,104 (0,994–15,950)	14,92
Аддитивна ^а	0,105	2,396 (0,833–6,893)	0,065	3,867 (0,919–16,279)	16,91
	0,914	0,938 (0,290–3,030)	0,806	0,810 (0,151–4,343)	

Примітка. Див. табл. 3.2.2

Аналіз за показниками ліпідів плазми крові, коагулограми та глюкози. Середні значення показників коагулограми, вмісту ліпідів плазми крові та глюкози натще у хворих з ІАТІ залежно від генотипу за поліморфізмом С1173Т гена *VKORC1* наведені у табл. 3.2.18. Порівняльний аналіз за допомогою тесту ANOVA не виявив значущого впливу досліджуваного поліморфного сайту гена *VKORC1* на перелічені вище показники ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2.18 – Клінічна характеристика хворих з ІАТІ залежно від варіантів генотипу за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1*, (M ± m)

Показник	Генотип			F	P
	C/C (n = 63)	C/T (n = 74)	T/T (n = 33)		
Загальний ХС, ммоль/л ^a	5,09±0,20	4,98±0,17	5,13±0,29	0,148	0,862
ХС-ЛПНГ, ммоль/л ^a	3,25±0,19	3,22±0,16	3,35±0,28	0,094	0,910
ХС-ЛПДНГ, ммоль/л ^a	0,79±0,05	0,75±0,04	0,78±0,07	0,198	0,820
ХС-ЛПВГ, ммоль/л ^a	1,05±0,04	1,01±0,04	1,00±0,06	0,401	0,670
Тригліцериди, ммоль/л ^a	1,74±0,11	1,66±0,09	1,72±0,16	0,198	0,820
Індекс атерогенності ^a	4,61±0,43	4,68±0,38	5,46±0,86	0,651	0,523
Протромбіновий час, с	9,56±0,26	9,62±0,24	8,99±0,34	1,169	0,313
Тромбіновий час, с	16,6±0,45	16,7±0,42	16,0±0,63	0,486	0,616
Фібриноген, г/л	3,85±0,15	3,85±0,15	4,26±0,19	1,498	0,227
Спонтанний фібриноліз, хв	479,4±4,3	477,5±4,3	483,3±7,2	0,291	0,748
Глюкоза крові, ммоль/л	6,02±0,20	5,85±0,16	5,90±0,29	0,230	0,795

Примітка: n – кількість пацієнтів; ХС – холестерол; ЛПНГ – ліпопротеїни низької густини; ЛПДНГ – ліпопротеїни дуже низької густини; ЛПВГ – ліпопротеїни високої густини;

^a n = 59 для C/C-генотипу; n = 69 для C/T-генотипу та n = 29 для T/T-генотипу

Вплив на основні характеристики ІАТІ. Розподіл хворих з ІАТІ на підгрупи за тяжкістю хвороби дав можливість провести вивчення впливу С1173Т-поліморфного сайту гена *VKORC1* на зазначену клінічну характеристику інсульту (табл. 3.2.19). За результатами аналізу за допомогою критерію Пірсона було зроблено висновок, що розподіл генотипів за досліджуваним SNP значущо не відрізнявся між пацієнтами з різним ступенем тяжкості ІАТІ (P = 0,677).

Таблиця 3.2.19 – Вплив поліморфізму С1173Т гена *VKORC1* на тяжкість клінічного перебігу ІАТІ

Генотип	Ступінь тяжкості перебігу			P
	легкий	середньої тяжкості	тяжкий	
С/С	24 (43,6 %)	21 (33,4 %)	10 (34,7 %)	0,677
С/Т	22 (38,2 %)	29 (43,9 %)	15 (49,0 %)	
Т/Т	17 (18,2 %)	24 (22,7 %)	8 (16,3 %)	
Разом	55 (100 %)	66 (100 %)	49 (100 %)	

Примітка. P – статистична значущість відмінностей за χ^2 -критерієм

Дослідження частоти генотипів за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у хворих із первинним та повторним ішемічним інсультом показало, що в першій підгрупі співвідношення С/С-гомозигот, гетерозигот та Т/Т-гомозигот становило 32,4, 45,7 та 21,9 %, а в іншій підгрупі – відповідно 44,6, 40,0 і 15,4 % (рис. 3.2.4). Порівняння розподілу наведених алельних варіантів не виявило значущої різниці між пацієнтами з первинним та повторним ІАТІ (P = 0,246).

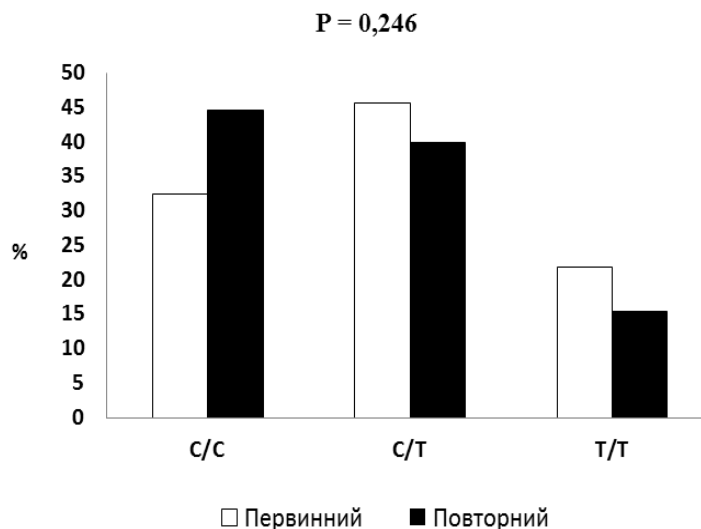


Рисунок 3.2.4 – Частота генотипів за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у хворих із первинним (білі стовпчики) та повторним (чорні стовпчики) ішемічним інсультом. P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Таким чином, можна зробити висновок про відсутність зв'язку між С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* та ІАТІ серед населення Північно-Східного регіону України. Аналіз з урахуванням інших факторів ризику атеросклерозу також не дозволив установити причетність зазначеного поліморфного локусу до розвитку інфаркту головного мозку. Разом із тим не виявлено впливу С1173Т-поліморфізму першого інтрона гена *VKORC1* на показники біохімічного аналізу крові хворих з ішемічним інсультом та основні клінічні характеристики ІАТІ.

3.3 Вплив Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* на розвиток атеротромботичного підтипу інфаркту головного мозку

Однонуклеотидний поліморфізм Arg406Arg (rs2592551, C8527T) являє собою заміну цитозину на тимін у 8 527-й позиції гена *GGCX* (ділянка дев'ятого екзона), що, однак, не приводить до заміни амінокислоти у 406-й позиції поліпептидного ланцюга γ -глутамілкарбоксилази.

Дані про частоту, з якою зустрічались основний (C) та мінорний (T) алелі, а також розподіл гомозигот за алелем дикого типу (C/C), гетерозигот (C/T) та гомозигот за мінорним алелем (T/T) за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* у пацієнтів з ІАТІ та представників контролю наведені у таблиці 3.3.1. З'ясовано, що наведений розподіл у дослідній та контрольній групах не мав статистично достовірних відхилень від очікуваних за генетично-популяційним законом величин ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3.1 – Частота генотипів та алелів за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* у контрольній групі і у хворих з ІАТІ

	Контрольна група	Хворі з ІАТІ
Гомозиготи C/C, n (%)	70 (56,5)	88 (51,8)
Гетерозиготи C/T, n (%)	50 (40,3)	66 (38,8)
Гомозиготи T/T, n (%)	4 (3,2)	16 (9,4)
С-алель	0,77	0,71
Т-алель	0,23	0,29
χ^2	1,94	0,49
P	> 0,05	> 0,05

Примітка: n – кількість пацієнтів; χ^2 і P відображають відхилення у кожній групі від рівноваги Харді – Вайнберга

На рис. 3.3.1 наведені результати порівняння частот алелів та трьох алельних варіантів, утворених за Arg406Arg-поліморфним сайтом гена *GGCX*, між групою хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та

особами контрольної групи. Показано, що ні розподіл алелів, ні генотипів в осіб обох груп порівняння статистично значущо не відрізнявся ($P = 0,140$ і $P = 0,113$ відповідно).

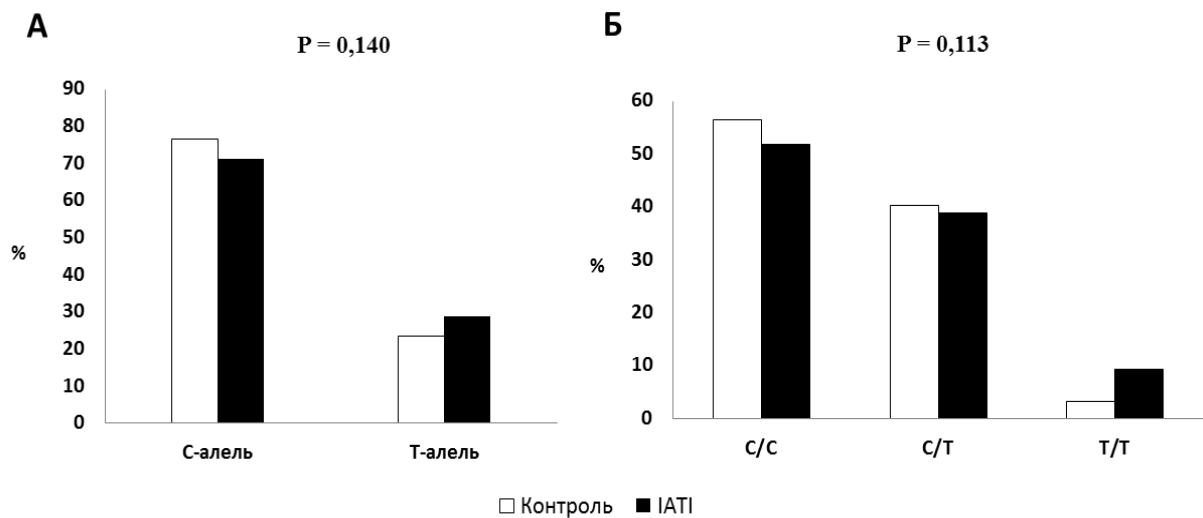


Рисунок 3.3.1 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Результати аналізу асоціації генотипів за Arg406Arg-поліморфним локусом гена *GGCX* з ІАТІ за допомогою логістичної регресії в рамках чотирьох моделей успадкування наведені в таблиці 3.3.2. Статистично значущий зв'язок був встановлений для рецесивної ($P_{\text{спост}} = 0,047$) та адитивної ($P_{\text{спост}} = 0,046$) моделей. Ризик розвитку ІАТІ у гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) був у 3,1 (95 % CI = 1,016–9,566) рази вищий, ніж у носіїв основного алеля (С/С і С/Т) (відповідно до рецесивної моделі) та у 3,2 (95 % CI = 1,018–9,946) рази вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (С/С) (відповідно до адитивної моделі). Проте статистична значущість цих показників зникла після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ та артеріальну гіпертензію ($P > 0,05$). Найменші значення показника критерію Акайке мала рецесивна модель (ІКА = 17,78).

Таблиця 3.3.2 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,426	1,208 (0,758–1,924)	0,860	0,949 (0,533–1,692)	21,86
Рецесивна	0,047	3,117 (1,016–9,566)	0,103	3,121 (0,794–12,274)	17,78
Наддомінантна	0,795	0,939 (0,585–1,508)	0,337	0,750 (0,416–1,350)	22,42
Адитивна ^а	0,843	1,050 (0,648–1,702)	0,526	0,823 (0,452–1,501)	19,74
	0,046	3,182 (1,018–9,946)	0,138	2,874 (0,713–11,593)	

Примітка: 95 % CI – 95 % довірчий інтервал; ІКА – інформаційний критерій Акайке; $P_{\text{спост}}$ – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR_{спост} – спостережуване відношення шансів; $P_{\text{попр}}$ – значення P після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ та АГ у загальній групі; поправки на вік, звичку палити, ІМТ та АГ у підгрупах за статтю; поправки на навік, стать, звичку палити та АГ у підгрупах за ІМТ; поправки на вік, стать, ІМТ та АГ у підгрупах за звичкою палити; OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріати.

^а Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння С/Т-генотипу з С/С-генотипом; другий рядок – порівняння Т/Т-генотипу з С/С-генотипом

Аналіз за статтю. Дослідження поліморфізму дев'ятого екзона гена *GGCX* окремо серед осіб жіночої статі показало, що у пацієток з ІАТІ частота основного С-алеля становила 0,722, а мінорного Т-алеля – 0,278. У групі контролю відповідно – 0,756 та 0,244. Розподіл С/С-, С/Т- та Т/Т-генотипів у жінок з інсультом становив 56,9, 30,6 і 12,5 % (у контролі – 51,5, 48,9 та 0,0 % відповідно). Результати порівняння частот алелів та генотипів за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* між особами жіночої статі груп порівняння наведені на рис. 3.3.2. Зазначено, що характер розподілу алельних варіантів у хворих з ІАТІ значущо відрізнявся від такого в групі контролю ($P = 0,016$). При цьому частоти алелі в зазначених групах були схожими ($P = 0,574$).

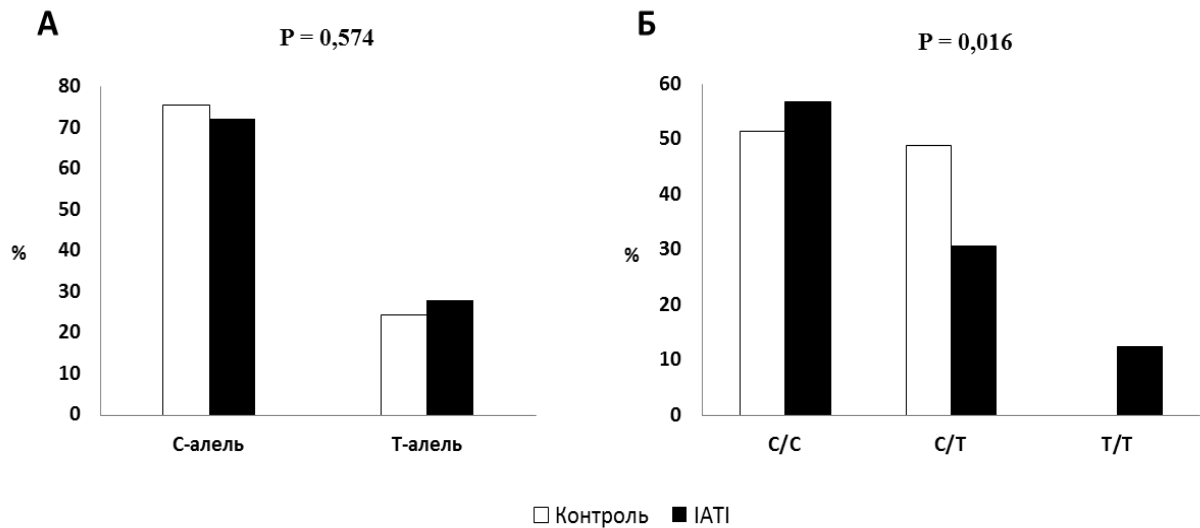


Рисунок 3.3.2 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* у жінок з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

У табл. 3.3.3 наведені результати вивчення зв'язку між поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* та розвитком ішемічного інсульту в осіб жіночої статі за допомогою методів логістичної регресії. Відсутність серед жінок контрольної групи гомозигот за мінорним алелем завадила провести розрахунок ризику розвитку ІАТІ для носіїв Т/Т-генотипу в рамках рецесивної та адитивної моделей успадкування.

Таблиця 3.3.3 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ в осіб жіночої статі з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,538	0,790 (0,374–1,670)	0,183	0,534 (0,212–1,345)	23,27
Рецесивна	0,014	–	–	–	–
Наддомінантна	0,048	0,460 (0,213–0,994)	0,046	0,474 (0,257–0,971)	20,16
Адитивна	0,147	0,561 (0,251–1,225)	0,095	0,450 (0,176–1,150)	14,78
	–	–	–	–	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Проте було встановлено, що в осіб жіночої статі з гетерозиготним генотипом ризик розвитку ІАТІ є достовірно нижчим, ніж у гомозигот за основним та мінорним алелями ($OR_{\text{спост}} = 0,460$; 95 % CI = 0,213–0,994; $P_{\text{спост}} = 0,048$) (відповідно до наддомінантної моделі). Необхідно відзначити, що достовірність результатів зберігалася навіть після долучення до аналізу таких факторів ризику, як вік, ІМТ, паління та артеріальна гіпертензія ($OR_{\text{попр}} = 0,474$; 95 % CI = 0,257–0,971; $P_{\text{попр}} = 0,046$). Найменше значення ІКА мала адитивна модель (14,78).

Результати дослідження асоціації Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* із розвитком ІАТІ серед чоловіків показали, що співвідношення основного та мінорного алелів у хворих з ішемічним інсультом становило 70,4 та 29,6 %, відповідно (у контролі – 77,2 та 22,8 % відповідно). Частота гомозигот за основним алелем, гетерозигот та гомозигот за мінорним алелем у чоловіків дослідної групи становила 56,9, 44,9 та 7,1 % відповідно (у контролі – 59,5, 35,4, 5,1 % відповідно). Застосування критерію Пірсона дало можливість встановити, що розподіл алелів ($P = 0,149$) та алельних варіантів ($P = 0,307$) за досліджуваним SNP достовірно не відрізнявся між чоловіками з інсультом та без нього (рис. 3.3.3).

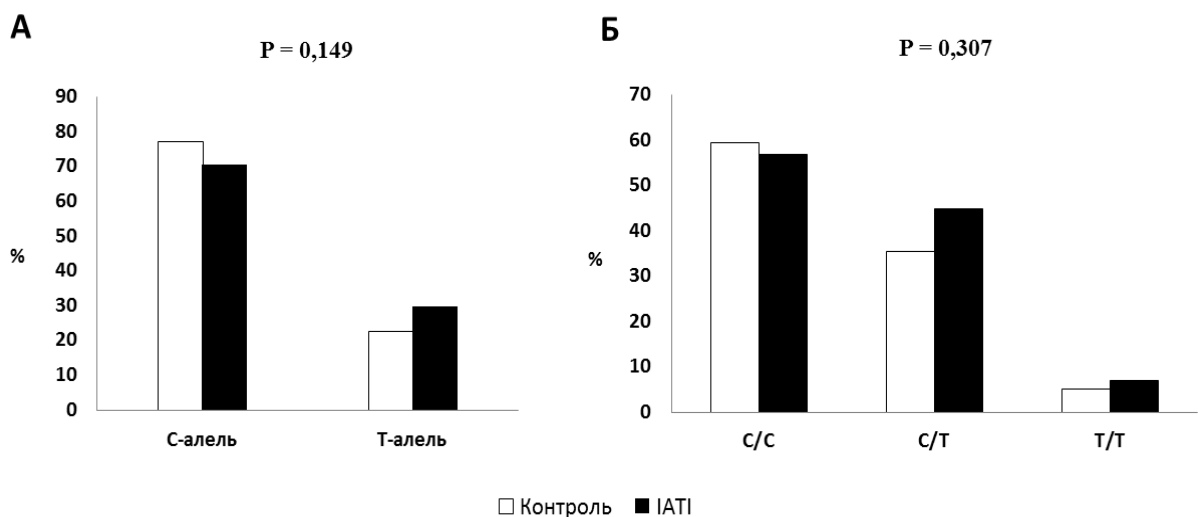


Рисунок 3.3.3 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* у чоловіків з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Застосування логістичної регресії показало, що жоден із генотипів за Arg406Arg-поліморфним сайтом гена *GGCX* не впливав на ризик розвитку ІАТІ в осіб чоловічої статі ($P > 0,05$) (табл. 3.3.4). Додавання до регресійного рівняння відомостей про вік, індекс маси тіла, звичку палити пацієнта та наявність у нього АГ також не дозволило виявити значущих зв'язків поліморфізму дев'ятого екзона гена *GGCX* із розвитком ішемічного інсульту серед чоловіків ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3.4 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ в осіб чоловічої статі з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,127	1,594 (0,876–2,901)	0,304	1,503 (0,691–3,268)	16,53
Рецесивна	0,571	1,442 (0,407–5,115)	0,210	2,751 (0,566–13,373)	18,55
Наддомінантна	0,204	1,484 (0,807–2,729)	0,693	1,171 (0,536–2,558)	17,25
Адитивна ^a	0,155	1,571 (0,843–2,930)	0,478	1,340 (0,597–3,010)	18,51
	0,396	1,750 (0,480–6,378)	0,167	3,142 (0,619–15,934)	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Аналіз за антропометричними даними. Середні значення показників зросту, маси тіла та ІМТ у носіїв кожного генотипу за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX*, а також результати дослідження асоціації зазначеного SNP із цими показниками наведені у таблиці 3.3.5. Було з'ясовано, що серед пацієнтів з ІАТІ та в осіб контрольної групи поліморфний сайт дев'ятого екзона гена *GGCX* не впливає на антропометричні показники.

Поряд із цим порівнянням масозростових показників між хворими з ішемічним інсультом та представниками контрольної групи було виявлено, що у пацієнтів з ІАТІ, які є носіями С/С-генотипу, середні значення зросту ($(168,6 \pm 0,93)$ см проти $(164,1 \pm 1,16)$ см; $P = 0,003$) і маси тіла ($(81,1 \pm 1,47)$ кг проти $(75,6 \pm 1,89)$ кг; $P = 0,021$) були вищими, ніж в осіб без ішемічного інсульту. У гетерозигот дослідної групи значення зросту ($(169,3 \pm 0,97)$ см проти $(162,2 \pm 1,39)$ см; $P < 0,001$) та маси тіла

((79,8 ± 1,43) кг проти (71,0 ± 1,75) кг; P < 0,001) також були вищими, ніж у групі контролю. Незважаючи на це, значення ІМТ у власників С/С- та С/Т-генотипів серед обох груп порівняння були схожими (P > 0,05). У гомозигот за мінорним алелем різниця у значеннях усіх антропометричних показників була відсутньою, якщо проводити порівняння між хворими з інсультом та контрольною групою (P > 0,05).

Таблиця 3.3.5 – Антропометричні показники у дослідній та контрольній групах залежно від генотипу за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX*, (M ± m)

		Генотип			F	P ₁
		C/C	C/T	T/T		
Зріст, см	Контроль	164,1±1,16 (70)	162,2±1,39 (49)	161,3±9,28 (4)	0,620	0,540
	IAT1	168,6±0,93 (88)	169,3±0,97 (66)	169,2±1,45 (16)	0,160	0,853
	P ₂	0,003	< 0,001	0,144		
Маса тіла, кг	Контроль	75,6±1,89	71,0±1,75	70,0±10,17	1,507	0,226
	IAT1	81,1±1,47	79,8±1,43	80,3±3,37	0,182	0,834
	P ₂	0,021	< 0,001	0,231		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	28,1±0,61	27,1±0,71	26,4±2,11	0,596	0,553
	IAT1	28,6±0,49	27,8±0,45	28,2±1,36	0,536	0,586
	P ₂	0,519	0,386	0,548		

Примітка: F – критерій Фішера; P₁ і P₂ – значущість відмінностей між генотипами за даними однофакторного дисперсійного аналізу (P₁) й між контролем та IAT1 за t-критерієм Стюдента (P₂). У дужках – кількість пацієнтів

Вивчення залежності антропометричних показників від поліморфного локусу Arg406Arg гена *GGCX* в осіб різної статі дало можливість встановити, що у жінок з IAT1 наведений поліморфізм достовірно впливає на значення показників зросту ((C/C – (163,1 ± 0,84) см; C/T – (162,6 ± 0,91) см; T/T – (168,4 ± 2,20) см; P = 0,015) (табл. 3.3.6). Апостеріорний тест Бонфероні показав, що існує значуща різниця між C/T- і T/T- (P = 0,020) та C/C- і T/T- (P = 0,020) генотипами. При цьому значення зросту у хворих жінок з C/C- і

C/T-генотипами були практично однаковими ($P = 0,999$). Вплив поліморфізму Arg406Arg гена *GGCX* на показники маси тіла та ІМТ у жінок з ІАТІ та на всі антропометричні показники жінок контрольної групи був відсутнім ($P > 0,05$). У чоловіків обох груп порівняння показники зросту, ваги тіла та ІМТ не залежали від генотипу за досліджуваним SNP ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3.6 – Антропометричні показники в осіб різної статі у групах порівняння залежно від генотипу за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX*, ($M \pm m$)

		Генотип			F	P ₁
		C/C	C/T	T/T		
Жінки						
Зріст, см	Контроль	156,3±1,24 (23)	155,8±2,30 (21)	–	0,031	0,860
	ІАТІ	163,1±0,84 (41)	162,6±0,91 (22)	168,4±2,20 (9)	4,434	0,015
	P ₂	< 0,001	0,008	–		
Маса тіла, кг	Контроль	69,2±2,68	70,3±2,43	–	0,094	0,761
	ІАТІ	78,8±1,94	74,6±1,97	79,4±5,39	1,004	0,372
	P ₂	0,005	0,175	–		
ІМТ ₂ кг/м ²	Контроль	28,3±1,03	29,2±1,16	–	0,301	0,586
	ІАТІ	29,7±0,73	28,2±0,70	28,2±2,18	0,933	0,398
	P ₂	0,264	0,460	–		
Чоловіки						
Зріст, см	Контроль	167,9±1,29 (47)	166,9±1,07 (28)	161,3±9,28 (4)	1,174	0,315
	ІАТІ	173,5±1,18 (47)	172,7±1,07 (44)	170,1±1,87 (7)	0,616	0,542
	P ₂	0,002	0,001	0,251		
Маса тіла, кг	Контроль	78,7±2,39	71,5±2,49	70,0±10,16	2,146	0,124
	ІАТІ	83,0±2,16	82,4±1,79	81,4±3,84	0,054	0,947
	P ₂	0,185	0,001	0,237		
ІМТ ₂ кг/м ²	Контроль	27,9±0,75	25,6±0,79	26,4±2,11	2,053	0,135
	ІАТІ	27,6±0,62	27,6±0,58	28,2±1,56	0,078	0,925
	P ₂	0,759	0,041	0,507		

Примітка. Див. табл. 3.3.5

Аналізом у межах окремих генотипів було з'ясовано, що у хворих жінок з С/С-генотипом були вищими значення показників зросту ((163,1 ± 0,84) см проти (156,3 ± 1,24) см; $P < 0,001$) та ваги ((78,8 ± 1,94) кг проти (69,2 ± 2,68) кг; $P = 0,005$), якщо порівнювати з відповідним контролем. У гетерозигот відмінності були виявлені лише у значеннях зросту. Так, хворі з С/Т-генотипом були вищими, ніж жінки-гетерозиготи контрольної групи ((162,6 ± 0,91) см проти (155,8 ± 2,30) см; $P = 0,008$). У жінок, які є гомозиготами за мінорним алелем, відмінностей в антропометричних показниках між двома групами порівняння виявлено не було ($P > 0,05$).

Дослідження серед осіб чоловічої статі показало, що хворі із С/С-генотипом були вищими, ніж відповідні особи без ознак ІАТІ ((173,5 ± 1,18) см проти (167,9 ± 1,29) см; $P = 0,002$). Натомість у чоловіків-гетерозигот з ішемічним інсультом зріст ((172,7 ± 1,07) см проти (166,9 ± 1,07) см; $P = 0,001$), вага ((82,4 ± 1,79) кг проти (71,5 ± 2,49) кг; $P = 0,001$) та ІМТ ((27,6 ± 0,58) проти (25,6 ± 0,79); $P = 0,041$) були більшими, ніж у чоловіків із С/Т-генотипом групи контролю. У Т/Т-гомозигот чоловічої статі різниці в значеннях антропометричних показників між групами порівняння виявлено не було ($P > 0,05$).

У таблиці 3.3.7 наведений розподіл генотипів за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* серед представників дослідної та контрольної груп після їх поділу на когорти, утворені залежно від значень ІМТ. Було встановлено, що частоти різних алельних варіантів за вивченим SNP у хворих з ІАТІ та представників контрольної групи істотно не відрізняються як в осіб із нормальним, так і з підвищеним ІМТ ($P = 0,361$ та $P = 0,202$ відповідно).

Таблиця 3.3.7 – Розподіл генотипів за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від показників ІМТ

Група	n	Генотип			P
		C/C (%) (95 % CI)	C/T (%) (95 % CI)	T/T (%) (95 % CI)	
ІМТ < 25 кг/м ²					
ІАТІ	41	20 (48,8) (33,5-64,1)	15 (36,6) (21,8-51,3)	6 (14,6) (3,8-25,5)	0,361
Контроль	38	19 (50,0) (31,1-65,9)	17 (44,7) (28,9-60,6)	2 (5,3) (0-12,4)	
ІМТ ≥ 25 кг/м ²					
ІАТІ	129	68 (52,7) (44,1-61,3)	51 (39,5) (31,1-48,0)	10 (7,8) (3,1-12,4)	0,202
Контроль	85	51 (60,0) (49,6-70,4)	32 (37,6) (27,4-48,0)	2 (2,4) (0-5,6)	

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за χ^2 -критерієм, 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Пошук зв'язку поліморфного сайту Arg406Arg гена *GGCX* із розвитком ішемічного інсульту в осіб із нормальним ІМТ із використанням методів логістичної регресії в рамках чотирьох моделей успадкування також не дозволив виявити достовірних результатів як до, так і після урахування віку, статі пацієнта, наявності в нього звички палити та артеріальної гіпертензії (табл. 3.3.8) (P > 0,05).

Таблиця 3.3.8 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ в осіб із нормальним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	P _{спост}	OR _{спост} (95 % CI)	P _{попр}	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,914	1,050 (0,434–2,539)	0,766	0,845 (0,278–2,567)	16,51
Рецесивна	0,185	3,086 (0,583–6,336)	0,397	2,741 (0,265–28,317)	14,53
Наддомінантна	0,461	0,713 (0,289–1,756)	0,457	0,647 (0,205–2,037)	15,98
Аддитивна ^a	0,712	0,838 (0,329–2,138)	0,561	0,706 (0,219–2,279)	16,39
	0,232	2,850 (0,511–15,901)	0,473	2,395 (0,220–26,024)	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Результати дослідження асоціації Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з розвитком ІАТІ в осіб із надмірною вагою за допомогою бінарної та мультіваріабельної логістичної регресії наведені в таблиці 3.3.9. Статистично значущого зв'язку зазначеного генетичного маркера з ризиком розвитку ішемічного інсульту виявлено не було ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3.9 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ в осіб із підвищеним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,294	1,346 (0,773–2,343)	0,981	0,992 (0,503–1,955)	18,90
Рецесивна	0,113	3,487 (0,745–16,330)	0,132	3,964 (0,661–23,789)	16,85
Наддомінантна	0,782	1,083 (0,617–1,902)	0,477	0,778 (0,389–1,553)	19,93
Адитивна ^a	0,541	1,195 (0,675–2,118)	0,666	0,857 (0,424–1,731)	18,47
	0,097	3,750 (0,787–17,863)	0,156	3,722 (0,605–22,882)	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Аналіз за показниками артеріального тиску. Середні значення показників артеріального тиску в осіб обох груп порівняння, а також аналіз залежності цих параметрів від генотипу за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* наведені у таблиці 3.3.10. Виявлено, що досліджуваний однонуклеотидний поліморфізм не впливає на показники різних видів АТ як серед контрольних осіб, так і серед хворих з ІАТІ ($P > 0,05$).

Порівняльний аналіз окремо в підгрупах за генотипами показав, що у гомозигот С/С з ІАТІ були вищими значення $AT_{\text{сист}}$ ((164,3 ± 3,2) мм рт. ст. проти (153,5 ± 2,6) мм рт. ст.; $P = 0,013$), $AT_{\text{діаст}}$ ((94,8 ± 1,7) мм рт. ст. проти (85,8 ± 1,3) мм рт. ст.; $P < 0,001$) та $AT_{\text{сер}}$ ((118,0 ± 2,1) мм рт. ст. проти (108,4 ± 1,6) мм рт. ст.; $P = 0,001$), якщо порівнювати із контрольною групою. У гетерозигот з інсультом вищими, ніж у відповідному контролі, були значення $AT_{\text{сист}}$ ((170,7 ± 3,7) мм рт. ст. проти (150,4 ± 3,7) мм рт. ст.; $P < 0,001$), $AT_{\text{діаст}}$ ((95,6 ± 1,9) мм рт. ст. проти (87,4 ± 1,8) мм рт. ст.; $P = 0,003$), $AT_{\text{пульс}}$ ((75,1 ± 3,1) мм рт. ст. проти (63,1 ± 2,7) мм рт. ст.;

$P = 0,006$) та $AT_{сер}$ ($(120,6 \pm 2,2)$ мм рт. ст. проти $(108,4 \pm 2,2)$ мм рт. ст.; $P < 0,001$). У гомозигот за мінорним алелем з ІАТІ показники різних АТ достовірно не відрізнялися від таких у групі контролю ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3.10 – Показники артеріального тиску у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX*, ($M \pm m$)

		C/C	C/T	T/T	F	P ₁
АТ сист	Контроль	153,5±2,6 (68)	150,4±3,7 (49)	166,3±12,1 (4)	0,941	0,393
	ІАТІ	164,3±3,2 (88)	170,7±3,7 (66)	166,6±5,1 (16)	0,913	0,403
	P ₂	0,013	< 0,001	0,980		
АТ діаст	Контроль	85,8±1,3	87,4±1,8	83,0±15,1	0,368	0,693
	ІАТІ	94,8±1,7	95,6±1,9	97,2±3,4	0,168	0,846
	P ₂	< 0,001	0,003	0,164		
АТ пульс	Контроль	67,7±2,1	63,1±2,7	83,3±5,2	2,834	0,063
	ІАТІ	69,4±2,1	75,1±3,1	69,4±4,0	1,422	0,244
	P ₂	0,574	0,006	0,147		
АТ сер	Контроль	108,4±1,6	108,4±2,2	110,8±13,9	0,051	0,950
	ІАТІ	118,0±2,1	120,6±2,2	120,3±3,5	0,414	0,662
	P ₂	0,001	< 0,001	0,333		

Примітка. Див. табл. 3.3.5

У таблиці 3.3.11 наведені середні значення різних показників артеріального тиску в осіб обох статей залежно від генотипу за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX*. Виявлено, що цей SNP не впливає на АТ у жінок обох груп порівняння ($P > 0,05$). Разом із тим у чоловіків з ІАТІ значення $AT_{пульс}$ достовірно відрізняються в осіб із різними генотипами ($P = 0,048$). За допомогою поправки Бонфероні встановлено, що значуща різниця існує лише між носіями C/C- та C/T-генотипів ($P = 0,046$).

Таблиця 3.3.11 – Показники артеріального тиску в осіб різної статі в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за поліморфізмом Arg406Arg гена GGCX, ($M \pm m$)

		Генотип			F	P ₁
		C/C	C/T	T/T		
Жінки						
АТ сист	Контроль	150,2±5,1(23)	147,1±4,9 (21)	–	0,187	0,667
	IAT1	173,9±4,6 (41)	173,4±7,5 (22)	164,4±7,1 (9)	0,365	0,695
	P ₂	0,002	0,006	–		
АТ діаст	Контроль	85,7±2,4	86,0±2,3	–	0,008	0,929
	IAT1	99,0±2,5	98,9±3,0	97,8±4,9	0,024	0,976
	P ₂	0,001	0,002	–		
АТ пульс	Контроль	64,6±3,9	61,2±4,3	–	0,342	0,562
	IAT1	74,9±3,1	74,6±5,8	66,7±5,3	0,538	0,586
	P ₂	0,046	0,073	–		
АТ сер	Контроль	107,2±3,0	106,4±2,7	–	0,040	0,842
	IAT1	124,0±3,0	123,7±4,2	120,0±5,2	0,166	0,847
	P ₂	0,001	0,001	–		
Чоловіки						
АТ сист	Контроль	155,1±3,0 (45)	152,9±5,3 (28)	166,3±12,1 (4)	0,578	0,564
	IAT1	155,9±4,1 (47)	169,3±4,1 (44)	169,3±7,6 (7)	2,986	0,055
	P ₂	0,876	0,016	0,829		
АТ діаст	Контроль	85,9±1,6	88,4±2,6	83,0±15,0	0,469	0,628
	IAT1	91,2±2,2	94,0±2,5	96,4±4,7	0,575	0,565
	P ₂	0,056	0,141	0,315		
АТ пульс	Контроль	69,2±2,4	64,5±3,6	83,3±5,2	2,324	0,105
	IAT1	64,7±2,5	75,3±3,6	72,9±6,4	3,127	0,048
	P ₂	0,198	0,046	0,300		
АТ сер	Контроль	109,0±1,8	109,9±3,3	110,8±13,9	0,047	0,954
	IAT1	112,7±2,7	119,1±2,6	120,7±5,0	1,709	0,187
	P ₂	0,261	0,031	0,435		

Примітка. Див. табл. 3.3.5

Показники $AT_{\text{пульс}}$ між пацієнтами чоловічої статі з С/С- і Т/Т- та С/Т- і Т/Т-генотипами статистично не відрізнялися ($P = 0,986$ і $P = 0,999$ відповідно). Значення $AT_{\text{сист}}$, $AT_{\text{діаст}}$ та $AT_{\text{сер}}$ у чоловіків дослідної та контрольної груп не залежали від генотипу за поліморфізмом дев'ятого екзона гена *GGCX* ($P > 0,05$).

Застосування *t*-критерію для порівняння показників АТ між особами жіночої статі обох груп порівняння в межах окремих генотипів дало можливість установити, що у пацієток з С/С-генотипом були вищими значення $AT_{\text{сист}}$ ((173,9 ± 4,6) мм рт. ст. проти (150,2 ± 5,1) мм рт. ст.; $P = 0,002$), $AT_{\text{діаст}}$ ((99,0 ± 2,5) мм рт. ст. проти (85,7 ± 2,4) мм рт. ст.; $P = 0,001$), $AT_{\text{пульс}}$ ((74,9 ± 3,1) мм рт. ст. проти (64,6 ± 3,9) мм рт. ст.; $P = 0,046$) і $AT_{\text{сер}}$ (124,0 ± 3,0) мм рт. ст. проти (107,2 ± 3,0) мм рт. ст.; $P = 0,001$), ніж у відповідному контролі. У жінок-гетерозигот з ІАТІ були більш високими показники $AT_{\text{сист}}$ ((173,4 ± 7,5) мм рт. ст. проти (147,1 ± 4,9) мм рт. ст.; $P = 0,006$), $AT_{\text{діаст}}$ ((98,9 ± 3,0) мм рт. ст. проти (86,0 ± 2,3) мм рт. ст.; $P = 0,002$) та $AT_{\text{сер}}$ ((123,7 ± 4,2) мм рт. ст. проти (106,4 ± 2,7) мм рт. ст.; $P = 0,001$), ніж в осіб жіночої статі без ішемічного інсульту. Через відсутність серед контролю жінок із генотипом Т/Т аналізу у цій підгрупі проведено не було.

Під час аналізу в підгрупах за генотипами серед осіб чоловічої статі статистично значущі результати були одержані лише серед гетерозигот. Так, встановлено, що у пацієнтів із С/Т-генотипом були вищими показники $AT_{\text{сист}}$ ((169,3 ± 4,1) мм рт. ст. проти (152,9 ± 5,3) мм рт. ст.; $P = 0,016$), $AT_{\text{пульс}}$ ((75,3 ± 3,6) мм рт. ст. проти (64,5 ± 3,6) мм рт. ст.; $P = 0,046$) та $AT_{\text{сер}}$ ((119,1 ± 2,6) мм рт. ст. проти (109,9 ± 3,3) мм рт. ст.; $P = 0,031$), якщо порівнювати з чоловіками з цим генотипом групи контролю.

Розподіл різних алельних варіантів за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* в осіб із нормальним та підвищеним артеріальним тиском наведений у таблиці 3.3.12. Показано, що достовірна різниця в частотах генотипів за

наведеним поліморфним сайтом статистично не відрізнялася як в осіб з артеріальною гіпертензією ($P = 0,081$), так і без неї ($P = 0,260$).

Таблиця 3.3.12 – Розподіл генотипів за Arg406Arg-поліморфізмом гена GGCX у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від показників АТ

Група	n	Генотип			P
		C/C (%) (95 % CI)	C/T (%) (95 % CI)	T/T (%) (95 % CI)	
Нормальний АТ					
ІАТІ	42	28 (66,7) (52,4-80,9)	13 (31,0) (17,0-44,9)	1 (2,3) (0,0-7,0)	0,260
Контроль	48	24 (50,0) (35,9-64,2)	23 (47,9) (33,8-62,1)	1 (2,1) (0,0-6,1)	
Підвищений АТ					
ІАТІ	128	60 (46,9) (38,2-55,5)	53 (41,4) (32,9-49,9)	15 (11,7) (6,2-17,3)	0,081
Контроль	73	44 (60,3) (49,1-71,5)	26 (35,6) (24,6-46,6)	3 (4,1) (0,0-8,7)	

Примітка. Див. табл. 3.3.7

У таблиці 3.3.13 наведені результати аналізу зв'язку поліморфного сайту Arg406Arg гена GGCX із розвитком ішемічного інсульту в осіб із нормальним АТ у рамках різних моделей успадкування. Як бачимо, методом бінарної логістичної регресії не встановлено асоціації зазначеного SNP з ризиком розвитку ІАТІ ($P_{\text{спост}} > 0,05$). Проте після поправки на стать, вік, ІМТ та звичку палити з'ясувалося, що у носіїв мінорного Т-алеля ризик настання інфаркту головного мозку був достовірно меншим ($OR_{\text{попр}} = 0,314$; $95\% \text{ CI} = 0,105-0,940$; $P_{\text{попр}} = 0,038$), ніж у власників Т/Т-генотипу (відповідно до домінантної моделі). Поряд із цим у рамках аналізу в наддомінантній моделі виявлено, що у гетерозигот ризик розвитку ішемічного інсульту був нижчим ($OR_{\text{попр}} = 0,287$; $95\% \text{ CI} = 0,093-0,884$; $P_{\text{попр}} = 0,030$), ніж у гомозигот за основним та мінорним алелями. Дослідження в межах адитивної моделі показало, що у власників генотипу С/Т був нижчим ризик розвитку ІАТІ ($OR_{\text{попр}} = 0,287$; $95\% \text{ CI} = 0,093-0,892$;

$P_{\text{попр}} = 0,031$), якщо порівнювати із С/С-гомозиготами. Найкращою моделлю успадкування ознаки виявилася наддомінантна (ІКА = 13,77).

Таблиця 3.3.13 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ в осіб із нормальним АТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,112	0,500 (0,213–1,176)	0,038	0,314 (0,105–0,940)	13,91
Рецесивна	0,924	1,146 (0,069–18,913)	0,757	1,683 (0,062–45,373)	16,48
Наддомінантна	0,103	0,487 (0,205–1,158)	0,030	0,287 (0,093–0,884)	13,77
Аддитивна ^a	0,103	0,484 (0,203–1,158)	0,031	0,287 (0,093–0,892)	15,76
	0,915	0,857 (0,051–14,451)	0,961	1,088 (0,036–32,600)	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Регресійний аналіз серед осіб з артеріальною гіпертензією продемонстрував, що у гомозигот за мінорним алелем ризик настання ішемічного інсульту був у 3,7 раза вищим (95 % CI = 1,003–13,441; $P_{\text{спост}} = 0,049$), ніж у гомозигот за основним алелем (відповідно до адитивної моделі). Однак після урахування віку, статі, ІМТ та звички палити пацієнта значущість цих результатів втрачалася ($P_{\text{попр}} = 0,064$). Зв'язку поліморфізму Arg406Arg гена *GGCX* із розвитком ІАТІ в осіб з артеріальною гіпертензією під час аналізу в інших моделях виявлено не було ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3.14 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ в осіб із підвищеним АТ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,069	1,720 (0,960–3,081)	0,170	1,657 (0,806–3,406)	18,61
Рецесивна	0,082	3,097 (0,866–11,084)	0,089	3,970 (0,810–19,457)	18,28
Наддомінантна	0,419	1,277 (0,705–2,314)	0,622	1,199 (0,582–2,474)	21,31
Аддитивна ^a	0,196	1,495 (0,813–2,750)	0,353	1,426 (0,675–3,012)	18,59
	0,049	3,669 (1,003–13,441)	0,064	4,667 (0,917–23,751)	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Аналіз за звичкою палити. Порівняння частоти різних генотипів за Arg406Arg-поліморфним локусом гена *GGCX* серед тих, які не палять, продемонструвало близьку до рівня статистичної значущості відмінність між пацієнтами з ІАТІ та особами контролю ($P = 0,056$) (табл. 3.3.15). Різниця в розподілі генотипів між групами порівняння серед осіб, які палять, виявлено не було ($P = 0,572$).

Таблиця 3.3.15 – Розподіл генотипів за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* у пацієнтів з ІАТІ та в контрольній групі залежно від звички паління

Група	n	Генотип			P
		C/C (%) (95 % CI)	C/T (%) (95 % CI)	T/T (%) (95 % CI)	
Не палять					
ІАТІ	120	65 (54,2) (45,3-63,1)	45 (37,5) (28,8-46,2)	10 (8,3) (3,4-13,3)	0,056
Контроль	93	52 (55,9) (45,8-66,0)	40 (43,0) (33,0-53,1)	1 (1,1) (0-3,17)	
Палять					
ІАТІ	50	23 (46,0) (32,2-59,8)	21 (42,0) (28,3-55,7)	6 (12,0) (2,3-21,0)	0,572
Контроль	31	18 (58,0) (40,7-75,4)	10 (32,3) (15,8-48,7)	3 (9,7) (0-20,1)	

Примітка. Див. табл. 3.3.7

Аналіз зв'язку різних варіантів гена *GGCX* за Arg406Arg-локусом із розвитком ІАТІ з урахуванням звички палити показало, що генотип Т/Т у тих, які не палять, збільшував ризик настання ішемічного інсульту в 8,4 рази ($95\% \text{ CI} = 1,051\text{--}66,559$; $P_{\text{спост}} = 0,045$), якщо порівнювати з носіями основного алеля (відповідно до рецесивної моделі) (табл. 3.3.16). Проте статистична значимість OR втрачалася після поправки на вік, стать, ІМТ та артеріальну гіпертензію ($P_{\text{попр}} = 0,244$). Під час аналізу в інших моделях достовірних результатів виявлено не було ($P > 0,05$). Найменше значення критерію Акайке мала рецесивна модель (16,14).

Таблиця 3.3.16 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена GGCX з ІАТІ в осіб, які не палять, з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	P _{спост}	OR _{спост} (95 % CI)	P _{попр}	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,799	1,073 (0,623–1,850)	0,330	0,715 (0,365–1,403)	22,80
Рецесивна	0,045	8,364 (1,051–66,559)	0,244	4,013 (0,388–41,537)	16,14
Наддомінантна	0,416	0,795 (0,458–1,381)	0,154	0,609 (0,308–1,204)	22,20
Аддитивна ^a	0,713	0,900 (0,514–1,577)	0,211	0,645 (0,324–1,283)	18,01
	0,051	8,000 (0,992–64,532)	0,316	3,354 (0,314–35,788)	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Результати вивчення асоціації Arg406Arg-поліморфізму гена GGCX із розвитком інфаркту головного мозку в курців у рамках різних моделей успадкування наведені в табл. 3.3.17. Не виявлено впливу поліморфізму дев'ятого екзона гена GGCX на ризик настання ІАТІ в осіб, які палять, як до, так і після урахування віку, статі, ІМТ пацієнта та наявності в нього артеріальної гіпертензії ($P > 0,05$).

Таблиця 3.3.17 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена GGCX з ІАТІ в осіб, які палять, з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	P _{спост}	OR _{спост} (95 % CI)	P _{попр}	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,293	1,625 (0,658–4,016)	0,121	2,712 (0,768–9,574)	14,53
Рецесивна	0,747	1,273 (0,294–5,506)	0,174	3,685 (0,562–24,173)	15,54
Наддомінантна	0,382	1,521 (0,594–3,891)	0,514	1,502 (0,442–5,101)	14,87
Аддитивна ^a	0,317	1,643 (0,621–4,350)	0,244	2,215 (0,580–8,453)	16,53
	0,563	1,565 (0,343–7,135)	0,100	5,479 (0,722–41,608)	

Примітка. Див. табл. 3.3.2

Аналіз за показниками ліпідів плазми крові, коагулограми та глюкози.
Результати дослідження впливу різних генотипів за поліморфізмом Arg406Arg гена GGCX на показники глюкози крові натще, ліпопротеїнів плазми крові та деякі параметри коагулограми у пацієнтів з ішемічним інсультом наведені в таблиці 3.3.18. Однофакторним дисперсійним аналізом

було виявлено залежність концентрації глюкози крові від генотипів за досліджуваним поліморфним сайтом (C/C – (6,14 ± 0,18) ммоль/л, C/T – (5,55 ± 0,15) ммоль/л, T/T – (6,24 ± 0,44) ммоль/л; P = 0,040). Застосування поправки Бонфероні показало, що нижчі значення у пацієнтів з C/T-генотипом були близькими до рівня статистичної значущості, якщо порівнювати з гомозиготами за основним алелем (P = 0,053), і достовірно не відрізнялися від відповідного показника в осіб із T/T-генотипом (P = 0,303). Зв'язку різних генотипів з усіма іншими досліджуваними показниками встановлено не було (P > 0,05).

Таблиця 3.3.18 – Клінічна характеристика хворих з ІАТІ залежно від варіантів генотипу за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX*, (M ± m)

Показник	Генотип			F	P
	C/C (n = 88)	C/T (n = 66)	T/T (n = 16)		
Загальний ХС, ммоль/л ^a	5,11±0,16	4,93±0,19	5,14±0,49	0,278	0,758
ХС-ЛПНГ, ммоль/л ^a	3,28±0,15	3,21±0,18	3,25±0,46	0,035	0,966
ХС-ЛПДНГ, ммоль/л ^a	0,81±0,04	0,72±0,05	0,81±0,08	1,232	0,295
ХС-ЛПВГ, ммоль/л ^a	1,03±0,03	1,01±0,04	1,08±0,08	0,464	0,630
Тригліцериди, ммоль/л ^a	1,78±0,08	1,58±0,10	1,78±0,17	1,232	0,295
Індекс атерогенності ^a	4,83±0,39	4,79±0,46	4,59±0,97	0,031	0,969
Протромбіновий час, с	9,42±0,22	9,59±0,24	9,29±0,53	0,227	0,798
Тромбіновий час, с	16,5±0,39	16,7±0,42	16,3±1,04	0,131	0,878
Фібриноген, г/л	3,93±0,14	3,86±0,14	4,23±0,26	0,594	0,553
Спонтанний фібриноліз, хв	481,5±4,0	475,1±4,6	485,0±6,9	0,798	0,452
Глюкоза крові, ммоль/л	6,14±0,18	5,55±0,15	6,24±0,44	3,282	0,040

Примітка: n – кількість пацієнтів; ХС – холестерол; ЛПНГ – ліпопротеїни низької густини; ЛПДНГ – ліпопротеїни дуже низької густини; ЛПВГ – ліпопротеїни високої густини;

^a n = 83 для C/C-генотипу; n = 59 для C/T-генотипу та n = 15 для T/T-генотипу

Вплив на основні характеристики ІАТІ. Розподіл генотипів за Arg406Arg-поліморфним локусом гена *GGCX* у хворих із різним ступенем тяжкості ішемічного атеротромботичного інсульту поданий у таблиці 3.3.19. Виявлено, що поліморфізм дев'ятого екзона гена *GGCX* достовірно впливає на тяжкість перебігу ІАТІ ($P = 0,007$). Показано, що гомозиготи за мінорним алелем здебільшого страждали на тяжкий та середньої тяжкості ішемічний інсульт.

Таблиця 3.3.19 – Вплив Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* на тяжкість клінічного перебігу ІАТІ

Генотип	Ступінь тяжкості перебігу			P
	легкий	середньої тяжкості	тяжкий	
C/C	35 (63,6 %)	31 (47,0 %)	22 (44,9 %)	0,007
C/T	20 (36,4 %)	23 (34,8 %)	23 (46,9 %)	
T/T	0 (0,0 %)	12 (18,2 %)	4 (8,2 %)	
Разом	55 (100 %)	66 (100 %)	49 (100 %)	

Примітка. P – статистична значущість відмінностей за χ^2 -критерієм

Під час аналізу пацієнтів із первинним та повторним ІАТІ було виявлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* у першій підгрупі становило 56,2, 32,4 та 11,4 %, а в іншій підгрупі – відповідно 44,6, 49,2 та 6,2 % (рис. 3.3.4). Порівняльний аналіз частот зазначених генотипів не виявив достовірної відмінності між пацієнтами з первинним та повторним ішемічним інсультом ($P = 0,076$).

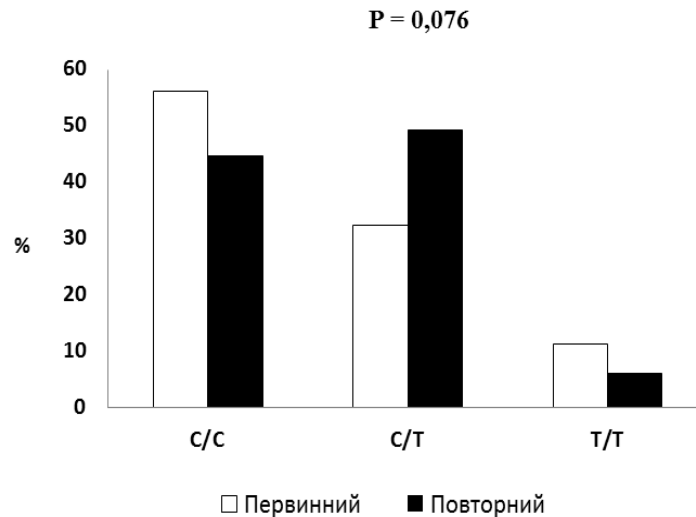


Рисунок 3.3.4 – Частота генотипів за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* у хворих із первинним (білі стовпчики) та повторним (чорні стовпчики) ішемічним інсультом. P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Отже, одержані в поданому розділі результати свідчать про те, що серед населення України існує зв'язок між Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* та розвитком ІАТІ. Показано, що гомозиготи за мінорним Т-алелем мають більшу ймовірність розвитку ішемічного інсульту, ніж носії основного С-алеля. Така асоціація, зокрема, є характерною для осіб з артеріальною гіпертензією та тих пацієнтів, які не мають звички палити. Натомість гетерозиготний генотип (С/Т) у жінок та осіб без артеріальної гіпертензії має достовірний протективний ефект щодо розвитку інфаркту головного мозку. Також виявлений вплив цього SNP на тяжкість перебігу ішемічного інсульту. Поряд із цим є підстави припускати, що Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* може впливати на концентрацію глюкози крові натще у хворих з ІАТІ.

3.4 Аналіз поєданого впливу поліморфізмів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту

Після генотипування представників обох груп порівняння за двома поліморфізмами (G-1639A та C1173T) гена *VKORC1* і поліморфним сайтом Arg406Arg гена *GGCX* та дослідження зв'язку окремо кожного з них із настанням ішемічного атеротромботичного інсульту нами був проведений комплексний аналіз поєданого впливу зазначених SNP на розвиток ІАТІ.

Першим кроком у цьому напрямку став аналіз на нерівноважне зчеплення між такими парами однонуклеотидних поліморфізмів: G-1639A (ген *VKORC1*) та C1173T (ген *VKORC1*); G-1639A (ген *VKORC1*) та Arg406Arg (ген *GGCX*); C1173T (ген *VKORC1*) та Arg406Arg (ген *GGCX*). Результати розрахунків наведені у таблиці 3.4.1.

Таблиця 3.4.1 – Аналіз на нерівноважне зчеплення між поліморфізмами генів циклу вітаміну К в осіб обох груп порівняння

Пара SNP	r^2	D'	P
G-1639A-C1173T	0,5182	0,8091	< 0,001
G-1639A-Arg406Arg	0,0092	0,0363	0,435
C1173T-Arg406Arg	0,0044	0,0523	0,609

Показано, що статистично значуще LD між поліморфізмом дев'ятого екзона гена *GGCX* та двома поліморфними сайтами гена вітамін-К-епоксидредуктази було відсутнім ($P < 0,05$). Поряд із цим було встановлено, що локуси G-1639A та C1173T гена *VKORC1* перебувають у міцному нерівноважному зчепленні ($D' = 0,809$, $r^2 = 0,518$). Така обставина дозволила визначити частоту гаплотипів, що утворюють названі SNP, та провести аналіз їх асоціації з розвитком ІАТІ (табл. 3.4.2).

Виявлено, що гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C у дослідній групі зустрічалися достовірно частіше, ніж у контролі, та значущо збільшували ризик розвитку інсульту (OR = 3,813; 95 % CI = 1,268–11,298;

$P = 0,010$ та $OR = 2,189$, $95\% CI = 1,185-4,045$; $P = 0,011$ відповідно). Натомість частота гаплотипу -1639G/1173C була вищою серед представників групи контролю, що свідчило про його протективну роль щодо настання ІАТІ ($OR = 0,548$; $95\% CI = 0,393-0,765$; $P < 0,001$). Різниці в частоті гаплотипу -1639A/1173T між групами порівняння виявлено не було ($P = 0,218$).

Таблиця 3.4.2 – Аналіз розподілу гаплотипів G-1639A/C1173T у хворих з ІАТІ та осіб контрольної групи

Гаплотип	ІАТІ		Контроль		P	OR	95 % CI
	2n	частота	2n	частота			
G-T	20	0,059	4	0,016	0,010	3,813	1,268–11,298
A-C	42	0,124	15	0,061	0,011	2,189	1,185–4,045
G-C	158	0,464	152	0,613	< 0,001	0,548	0,393–0,765
A-T	120	0,353	77	0,310	0,281	1,211	0,854–1,717

Примітка: n – кількість осіб; OR – відношення шансів; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Наступним етапом комплексного аналізу стало вивчення поєданого впливу поліморфізму генів системи циклу вітаміну К на розвиток ІАТІ за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності (MDR). Останній дозволяє проводити моделювання міжгенних взаємодій високого порядку, які неможливо оцінити, використовуючи традиційні параметричні методи генетичної епідеміології [27]. Найкращою з можливих моделей виявилася трилокусна G-1639A&C1173T&Arg406Arg, яка мала 100 % відтворюваність (Crossvalidation Consistency 10/10) та класифікаційну здатність 61 %. На рисунку 3.4.1 подана комбінація генотипів за поліморфними сайтами G-1639A, C1173T та Arg406Arg. Встановлено, що у разі збігу G/A- (G-1639A), C/T- (Arg406Arg) та C/T- (C1173T) генотипів, а також генотипів A/A (G-1639A), C/T (Arg406Arg) і T/T (C1173T) ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту зростає.

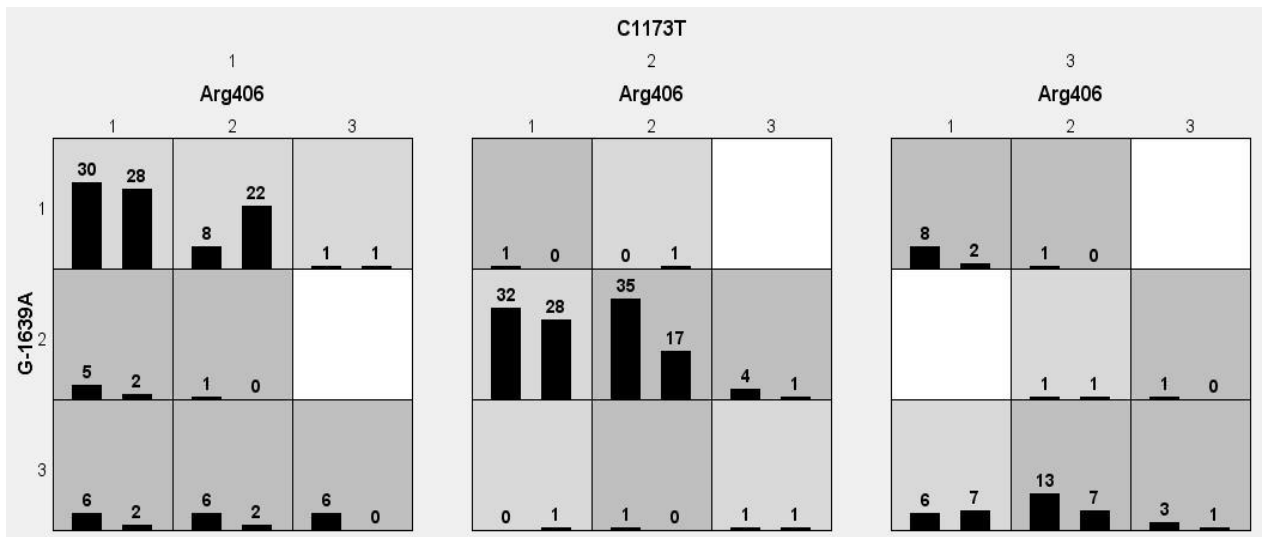


Рисунок 3.4.1 – Комбінації генотипів за поліморфізмами G-1639A, Arg406Arg та C1173T, що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику ІАТІ. Лівий стовпчик у межах кожної комірки відображає кількість випадків інсульту, правий стовпчик – кількість контролю. Темно-сірі комірки відповідають високому ризику, а світло-сірі – низькому ризику розвитку ІАТІ. Білі клітинки – відсутність комбінацій генотипів

Аналіз величини ентропії продемонстрував, що її найбільша частка щодо статусу «випадок – контроль» була пов'язана з G-1639A-поліморфним локусом і дорівнювала 1,78 % (рис. 3.4.2). Поліморфізми C1173T та Arg406Arg пояснювали 0,65 і 1,17 % ентропії відповідно.

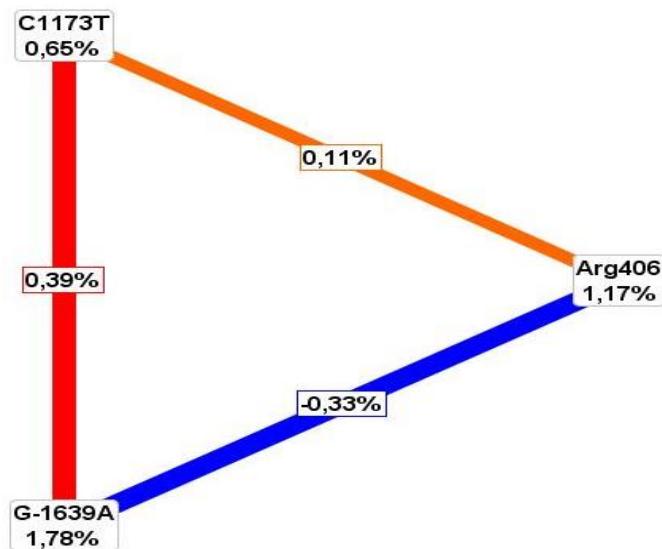


Рисунок 3.4.2 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ІАТІ. Червоним та оранжевим позначена синергічна взаємодія, синім – нейтралізуючий ефект

Аналіз міжлокусних взаємодій виявив слабкий синергічний ефект для G-1639A- і C1173T- (0,39 %) та для C1173T- і Arg406Arg- (0,11 %) локусів. Наприкінці були проведені пермутаційні тести, що не виявили статистичної значущості створеної трикомпонентної моделі для ІАТІ ($P = 0,234$).

Для поглибленого вивчення поєднаного впливу одонуклеотидних поліморфізмів досліджуваних у поданій роботі генів на розвиток ішемічного інсульту був реалізований аналіз із застосуванням методу MDR окремо серед осіб різних статей. У жінок, як і в загальній групі, трилокусна модель G-1639A&C1173T&Arg406Arg виявилася найкращою. Прогностична здатність останньої на навчальній вибірці (Training Balanced Accuracy) становила 64 %, а на тестованій (Testing Balanced Accuracy) – лише 44 %. Крос-перевірна здатність при цьому становила 10/10 (Crossvalidation Consistency). На рисунку 3.4.1 наведені комбінації генотипів за поліморфними сайтами G-1639A, C1173T та Arg406Arg. Показано, що у разі збігу G/A- (G-1639A), C/T- (C1173T) генотипів та будь-якого алельного варіанту за Arg406Arg-поліморфним локусом ризик розвитку ІАТІ в осіб жіночої статі зростає.

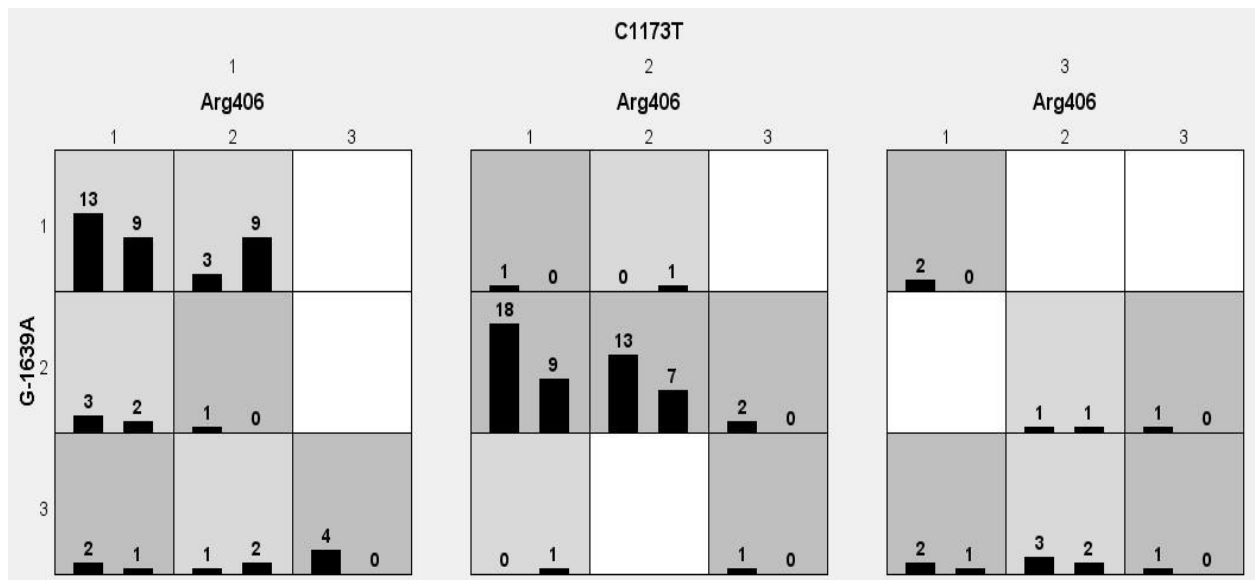


Рисунок 3.4.3 – Комбінації генотипів за поліморфізмами G-1639A, Arg406Arg та C1173T, що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику ІАТІ в осіб жіночої статі. Пояснення див. на рис. 3.4.1

Також встановлено, що найбільший незалежний ефект стосовно статусу «випадок – контроль» у жінок був пов'язаний із поліморфним локусом Arg406Arg гена *GGCX* (6,98 %) (рис. 3.4.4). Вивчення міжлокусних взаємодій дало можливість виявити виражений нейтралізуючий ефект між Arg406Arg- і C1173T- (-5,52 %) та між Arg406Arg- і G-1639A- (-4,26 %) поліморфними сайтами. Після проведення пермутаційних тестів було з'ясовано, що дана модель не досягає рівня статистичної значущості ($P = 0,716$).

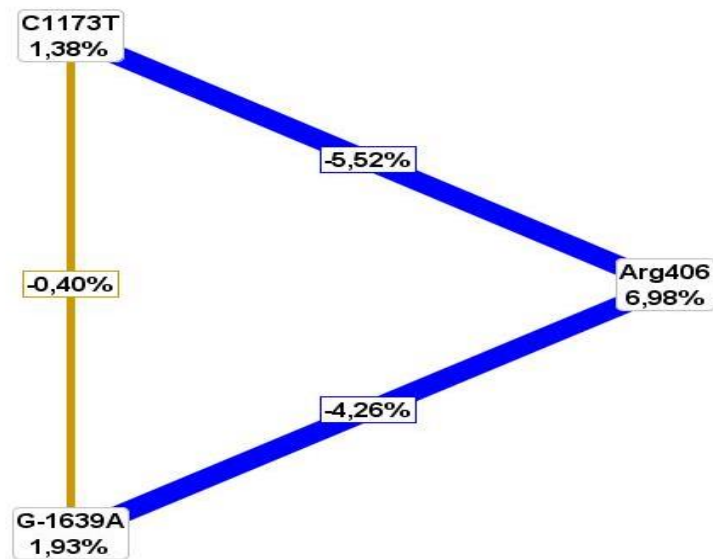


Рисунок 3.4.4 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ІАТІ в осіб жіночої статі. Синім позначений нейтралізуючий ефект, коричневим – слабка взаємодія

Застосування методу MDR для аналізу поєднаного впливу поліморфних сайтів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного інсульту в осіб чоловічої статі дозволило виявити, що найкращою моделлю серед можливих виявилась та, яка включала усі три досліджувані SNP. На рисунку 3.4.5 подані комбінації алельних варіантів за цими генетичними маркерами. Зазначено, що поєднання G/A- (G-1639A), C/T- (Arg406Arg) та C/T- (C1173T) генотипів, а також A/A- (G-1639A), C/T- (Arg406Arg) і T/T- (C1173T) генотипів призводить до зростання ризику розвитку ІАТІ. На тестованій вибірці така модель мала прогностичну здатність 63 % (крос-перевірна здатність – 10/10).

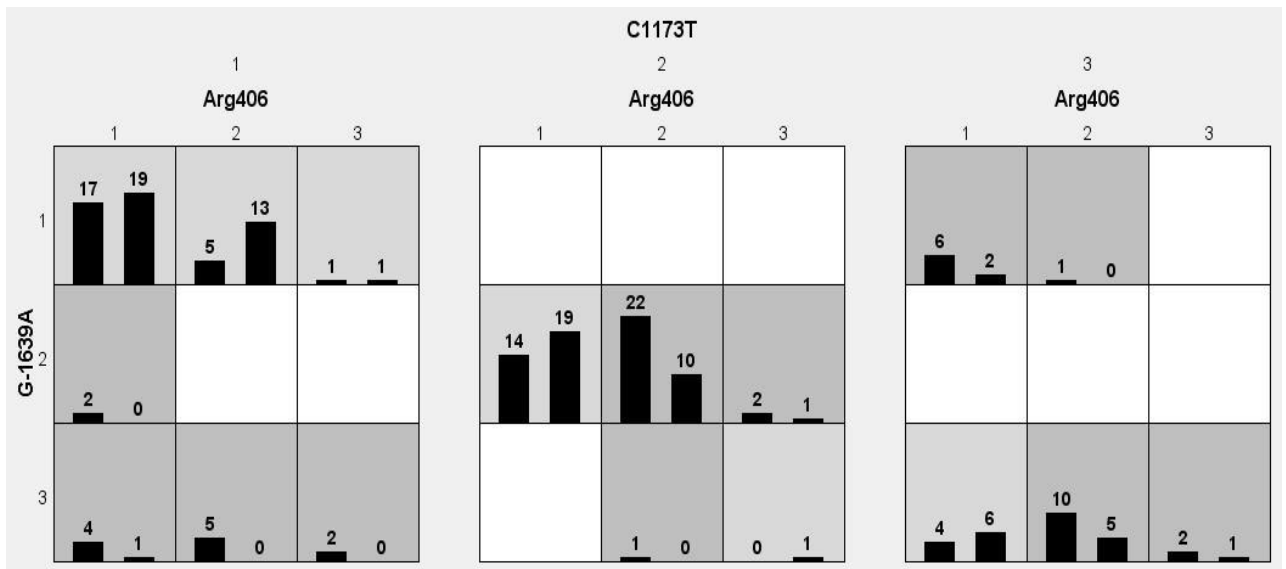


Рисунок 3.4.5 – Комбінації генотипів за поліморфізмами G-1639A, Arg406Arg та C1173T, що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику ІАТІ в осіб чоловічої статі. Пояснення див. на рис. 3.4.1

Також було встановлено, що найбільша частка ентропії серед усіх локусів припадала на G-1639A (1,85 %) (рис. 3.4.6). Поряд із цим спостерігався вагомий синергічний ефект між G-1639A- і Arg406Arg- (1,11 %) та між C1173T- і Arg406Arg- (1,07 %) поліморфними сайтами. Проте пермутаційні тести не підтвердили статистичну значущість такої моделі ($P = 0,267$).

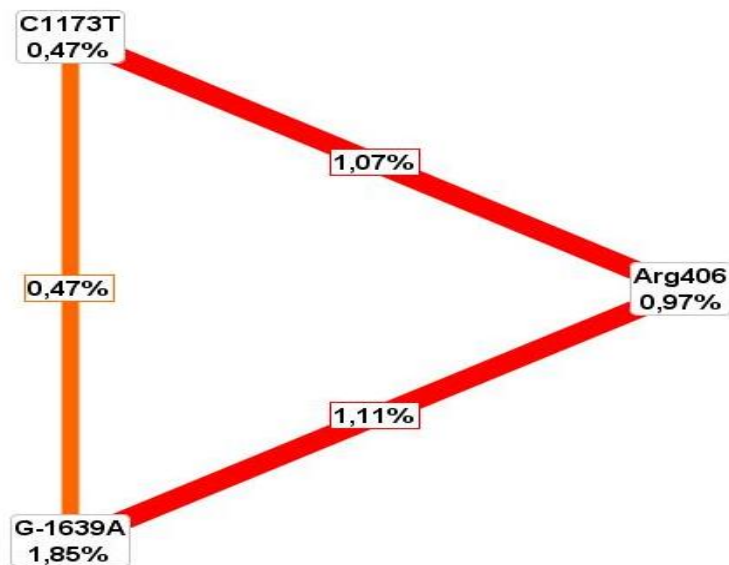


Рисунок 3.4.6 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ІАТІ в осіб чоловічої статі. Червоним та оранжевим позначена синергічна взаємодія

Враховуючи той факт, що ішемічний атеротромботичний інсульт є мультифакторіальною патологією, останнім етапом нашого дослідження став аналіз поєднаного впливу як генетичного поліморфізму, так й інших відомих факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ за допомогою методу зменшення багатфакторної розмірності. Серед усіх можливих моделей найбільшу прогностичну здатність на тестованій вибірці (61 %) мала двокомпонентна модель, що включала поліморфний сайт G-1639A гена *VKORC1* та артеріальну гіпертензію (крос-перевірна здатність – 10/10). На рисунку 3.4.7 показані комбінації зазначеного генетичного чинника з наявністю чи відсутністю у пацієнтів АГ. Як бачимо, наявність у носіїв мінорного алеля за поліморфізмом промотору гена *VKORC1* (генотипи G/A та A/A) та підвищеного артеріального тиску призводить до зростання ризику розвитку ішемічного інсульту. Рандомізовані тести показали, що така двокомпонентна модель досягає рівня статистичної значущості ($P = 0,022$).

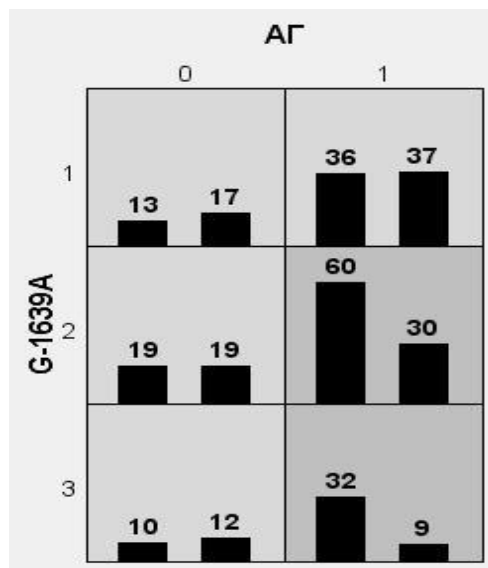


Рисунок 3.4.7 – Комбінації генотипів за поліморфізмом G-1639A та артеріальної гіпертензії, що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику ІАТІ. Пояснення див. на рис. 3.4.1

Кластерний аналіз продемонстрував, що найбільш незалежний ефект серед усіх факторів мав поліморфний сайт G-1639A (1,78 %), артеріальна гіпертензія (1,61 %) та поліморфізм Arg406Arg (1,17 %) (рис. 3.4.8). Міжфакторна взаємодія характеризувалася слабким синергізмом між АГ та

статтю (0,74 %), між двома SNP гена *VKORC1* (0,39 %) та між АГ і поліморфним сайтом G-1639A (0,32 %). Натомість між АГ та поліморфізмом Arg406Arg спостерігався нейтралізуючий ефект (-0,76 %).

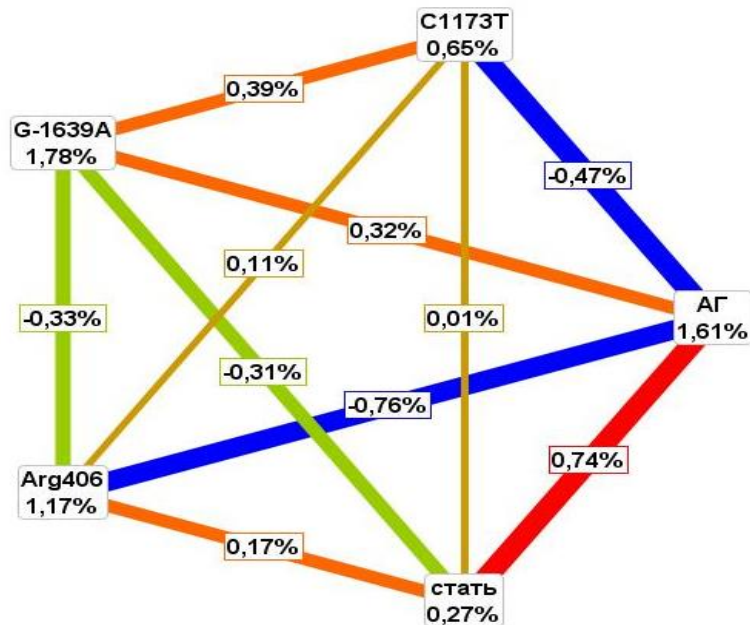


Рисунок 3.4.8 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжфакторної взаємодії методом MDR при ІАТІ. Червоним та оранжевим позначена синергічна взаємодія, синім – нейтралізуючий ефект

Таким чином, результати проведеного комплексного аналізу показали, що особи з гаплотипами -1639G/1173T та -1639A/1173C мають підвищений ризик розвитку ІАТІ, а -1639G/1173C-гаплотип пов'язаний зі зменшенням ризику цієї недуги. Натомість створена на основі трьох досліджуваних поліморфізмів класифікаційна модель мала слабку прогностичну здатність, як у загальній групі, так і серед осіб різної статі. При цьому аналіз поєднаного впливу зовнішніх і внутрішніх факторів на розвиток ІАТІ виявив статистично значущу двокомпонентну модель, що містила поліморфізм G-1639A та АГ (прогностична здатність 61 % за методом MDR). Поєднання в однієї особи носійства мінорного А-алеля за зазначеним поліморфним локусом з артеріальною гіпертензією пов'язане з високим ризиком настання ішемічного атеротромботичного інсульту.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Одним із найнебезпечніших різновидів судинного ураження головного мозку з огляду на поширеність та високу смертність є ішемічний атеротромботичний інсульт, у розвитку якого важливу роль відіграють процеси ектопічної кальцифікації та розлади системи гемостазу. У низці досліджень показано, що відкладення солей кальцію в атероматозній бляшці належить до основних причин її дестабілізації та розриву [214, 219, 240], а порушення балансу між активністю про- та антикоагулянтних протеїнів стає причиною посиленого тромбоутворення [98, 166, 194]. З-поміж ймовірних чинників, що можуть стосуватися розвитку вищенаведених змін, все більшої уваги приділяють вітамін-К-залежним білкам, серед яких деякі фактори згортання крові, компоненти антикоагулянтної системи, антикальциногенні протеїни, а також білки, що беруть участь у реакціях формування тромбоцитарного тромбу та диференціюванні гладко-м'язових клітин судин.

Необхідною умовою активації VKDPs є посттрансляційна модифікація у вигляді γ -карбоксилювання специфічних залишків глютамінової кислоти у циклі вітаміну К [233]. Основними ферментами, що забезпечують зазначений процес, є γ -глутамілкарбоксилаза та вітамін-К-епоксидредуктаза. Це дає можливість припустити, що порушення процесів γ -карбоксилювання внаслідок генетичного поліморфізму *GGCX* та *VKORC1* може стати причиною дисфункції усєї групи вітамін-К-залежних білків, що в кінцевому підсумку сприятиме прискореному росту атероматозної бляшки, її мінералізації, розриву та тромбозу.

Тому метою нашої роботи стало з'ясування ролі поліморфізму генів циклу вітаміну К у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту з урахуванням деяких відомих факторів ризику гострих порушень мозкового

кровообігу (стать, індекс маси тіла, артеріальна гіпертензія, паління, порушення системи коагуляції та ліпопротеїнового складу плазми крові).

Результати проведеного рестрикційного аналізу дали можливість установити частоту, з якою зустрічаються алелі та генотипи за трьома поліморфними варіантами генів циклу вітаміну К у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та осіб групи порівняння.

Розподіл гомозигот за основним алелем (G/G), гетерозигот (G/A) та гомозигот за мінорним алелем (A/A) за G-1639A-поліморфним локусом гена *VKORC1* в осіб групи контролю становив 43,5, 39,6 і 16,9 % відповідно. Частота основного G-алеля при цьому склала 0,63, мінорного A-алеля – 0,37. Ураховуючи важливу роль поліморфних варіантів гена *VKORC1* у розвитку ряду патологічних процесів та хвороб, а також їх вплив на дозуванні оральних антикоагулянтів, вчені багатьох країн проводять аналіз частоти алелів та генотипів за найбільш значущими поліморфними сайтами у представників різних народностей. При цьому необхідно зазначити, що частоти, з якими зустрічаються різні алелі за поліморфізмом промотору гена *VKORC1* істотно відрізняються серед представників різних популяцій. Так, згідно з даними You et al. мінорним алелем у китайській популяції є G-алель, частота якого дорівнює 0,09 [254]. Натомість основний A-алель зустрічається в цій популяції з частотою 0,91. Подібні дані були одержані також і під час досліджень серед населення Японії [89, 255] та Кореї [86]. Роботи, проведені в країнах Західної та Центральної Азії, продемонстрували зовсім інші результати. Так, мінорним алелем за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* у країнах цього регіону є A-варіант, який в Індії має частоту 0,14 [110], в Ізраїлі – 0,43 [69], в Туреччині – 0,47 [225], в Росії – 0,33 [179]. Подібна картина спостерігається і серед країн Європи. У Греції частота мінорного A-алеля становить 0,44 [56], в Литві – 0,34 [227], у Німеччині – 0,44 [209]. Щодо української популяції, то лише у праці Малярчук та співавт. із вивчення значення поліморфного сайту G-1639A для дозування варфарину

зазначається, що мінорний А-алель зустрічається з частотою 0,39 [5], що збігається з нашими даними.

Результати генотипування осіб групи контролю за поліморфним сайтом С1173Т гена *VKORC1* показали, що співвідношення гомозигот С/С, гетерозигот С/Т та гомозигот Т/Т у ній становить 47,6, 37,9 і 14,5 % відповідно. «Дикий» С-алель у зазначеній групі має частоту 0,67, а мінорний Т-алель – 0,33. Розподіл алелів за вказаним поліморфним сайтом серед населення країн Європи є подібним. Було показано, що у німців мінорний Т-алель зустрічається з частотою 0,44 [209], а у французів частота Т-алеля становить 0,39 [75]. Натомість результати вивчення подібного розподілу, одержані Zhang et al., свідчать, що серед населення Китаю мінорним є С-алель (частота 0,07), тоді як частота основного Т-алеля становить 0,93 [43].

Вивчення розподілу різних алельних варіантів за поліморфним локусом Arg406Arg гена *GGCX* показало, що співвідношення гомозигот за основним алелем (С/С), гетерозигот (С/Т) та гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) серед осіб контрольної групи складає 56,5, 40,3 і 3,2 %, відповідно. При цьому частота мажорного С-алеля становить 0,77, а мінорного алеля Т – 0,23. На відміну від поліморфізмів гена *VKORC1* частоти алелів за SNP Arg406Arg гена *GGCX* є приблизно однаковими серед представників різних рас та популяцій. Так, Schelleman et al., вивчаючи вплив генетичного поліморфізму на дозування варфарину, показали, що частота мінорного Т-алеля за вказаним локусом серед європеїдного населення США становить 0,31, а серед афроамериканців – 0,49 [160]. Подібне дослідження, виконане Kamali et al. в Китаї, продемонструвало, що в місцевих жителів Т-алель зустрічається з частотою 0,28 [51].

Таким чином, виходячи з вищенаведеного можна зазначити, що частоти алелів за однонуклеотидними поліморфізмами G-1639А та С1173Т гена *VKORC1* та поліморфним локусом Arg406Arg гена *GGCX*, які ми виявили серед населення Північно-Східного регіону України, відповідають таким у більшості популяцій країн Європи.

Вивчення розподілу алелів та генотипів за поліморфними сайтами генів циклу вітаміну К у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом показало, що співвідношення G/G-, G/A- та A/A-генотипів за локусом G-1639A гена *VKORC1* становило в цій групі 28,8, 46,5 і 24,7 % відповідно. Розподіл C/C-, C/T- та T/T-варіантів за сайтом C1173T серед пацієнтів з ІАТІ склав 37,1, 43,5 і 19,4 % відповідно. Гомозиготи за основним алелем (C/C), гетерозиготи (C/T) та гомозиготи за мінорним алелем (T/T) за поліморфним локусом Arg406Arg гена *GGCX* у дослідній групі розподілені так: 51,8, 38,8 і 9,4 %. Порівняльний аналіз наведених даних з результатами генотипування осіб контрольної групи показав, що існує зв'язок між ішемічним атеротромботичним інсультом та поліморфними варіантами G-1639A гена *VKORC1* та Arg406Arg гена *GGCX*, тоді як поліморфізм C1173T першого інтрона гена *VKORC1* з розвитком даної недуги не асоційований. Було з'ясовано, що у носіїв мінорного А-алеля за G-1639A-поліморфним локусом промотору гена *VKORC1* ризик розвитку ІАТІ у 2,1 раза вищий, ніж у гомозигот G/G. Необхідно зазначити, що статистична значущість цих результатів зберігалась і після врахування статі, віку, ІМТ, наявності АГ та звички палити, що свідчило про сильну прогностичну здатність цього предиктора. Поряд із цим у гомозигот T/T за Arg406Arg-поліморфним сайтом дев'ятого екзона гена *GGCX* ризик інфаркту головного мозку був у 3,1 раза вищий, ніж у носіїв основного алеля. Проте після поправки на інші фактори ризику атеросклерозу достовірність цих даних втрачалася.

Результати інших авторів щодо пошуку зв'язку різних поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К із розвитком судинного ураження головного мозку ішемічного генезу доволі суперечливі та неоднозначні.

З одного боку, дані, які ми одержали, повністю узгоджуються з такими самими даними у роботі Du et al., які повідомили про зв'язок поліморфних сайтів G-1639A і T2255C гена *VKORC1* зі схильністю до кардіоваскулярних та цереброваскулярних хвороб у китайській популяції [248]. Дослідники установили, що особи з -1639A- та 2255C-алелями мають підвищений ризик

розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту. Також у нещодавньому дослідженні Garbuzova et al. була проаналізована наявність асоціації поліморфізму T2255C гена *VKORC1* з розвитком ІАТІ в українській популяції, у результаті чого автори показали, що ризик розвитку ішемічного інсульту в осіб із C/C-генотипом за зазначеним поліморфним сайтом є достовірно вищим, ніж у носіїв T/T-генотипу [44].

З іншого боку, Zhang et al., досліджуючи вплив поліморфізмів G-1639A та C1173T гена *VKORC1* на розвиток ішемічного інсульту в китайській популяції, повідомили, що носії -1639G- (частота 0,114), або 1173C- (частота 0,074) алелів більш схильні до цього захворювання [43]. Подібні результати були одержані Wang et al., які продемонстрували, що алель 2255C за поліморфним T2255C-сайтом другого інтрона гена *VKORC1* майже удвічі збільшує ризик ішемічного інсульту, ішемічної хвороби серця та розшарування аорти в китайській популяції [250]. Крім того, Shyu et al., вивчаючи зв'язок поліморфізму генів *GGCX* (Arg325Gln), *VKORC1* (G-1639A) та *NQO1* (Pro187Ser) із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту, показали, що алелі 325Gln, -1639A та 187Ser мають захисний ефект щодо розвитку ІАТІ серед населення Тайваню [113].

Поряд із цим більшість досліджень, виконаних в Європі та Північній Америці, не виявили асоціації між генетичним поліморфізмом генів *VKORC1* і *GGCX* та розвитком цереброваскулярних хвороб. Ragia et al. не знайшли значущої різниці в розподілі генотипів за G-1639A-поліморфним сайтом між грецькими пацієнтами з ішемічним інсультом та контрольною групою [50]. У роботі Hindorff et al. не встановлено достовірної асоціації поліморфних сайтів G-1639A та C1173T гена *VKORC1* з інфарктом міокарда, ішемічним інсультом та венозним тромбозом серед населення США [71]. Відповідно до цього два дослідження, виконані в Бельгії [139] та Німеччині [209], також не виявили зв'язку між поліморфними локусами G-1639A, C1173T та T2255C гена *VKORC1* та різними підтипами ішемічного інсульту. Під час дослідження в українській популяції не встановлено асоціації поліморфізму

Arg325Gln гена *GGCX* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту [44].

Метааналіз більшості перелічених робіт, виконаний Li et al. у 2015 році, продемонстрував, що поліморфні сайти G-1639A і T2255C гена *VKORC1* пов'язані з ризиком розвитку цереброваскулярних та кардіоваскулярних захворювань [144]. Разом із цим автори наголосили, що через значні відмінності в частоті алелів серед населення різних країн, через різні підходи до інтерпретації результатів, що їх одержують вчені під час досліджень, а також через незначну кількість робіт стосовно зв'язку поліморфних варіантів гена *VKORC1* з розвитком серцево-судинних захворювань неможливо поки що зробити остаточний висновок про їх вплив на розвиток як інфаркту міокарда, так й ішемічного інсульту.

Як відомо, розвиток інфаркту головного мозку та тяжкість його проявів багато в чому залежить від статі, віку, ваги пацієнта, а також наявності в нього артеріальної гіпертензії, звички паління, цукрового діабету тощо.

Серед перелічених факторів ризику одним із найважливіших є стать. Показано, що чоловіки віком від 35 до 70 років мають на 30 % більшу ймовірність захворіти на інсульт, якщо порівнювати з жінками цієї самої вікової категорії [30, 31]. Поряд із цим також встановлено, що розвиток атеросклеротичного ураження артерій серед осіб чоловічої статі вікової групи 40–70 років трапляється у 92 % випадків, тоді як у жінок цього ж віку – лише у 48 % [256].

У роботі, яку ми виконали, вплив досліджуваних генетичних чинників на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту мав статеві особливості. Після поправки на вік, ІМТ, артеріальну гіпертензію та паління виявилось, що жінки, які є носіями мінорного А-алеля за поліморфним локусом G-1639A гена *VKORC1*, мають у 2,9 раза вищий ризик розвитку ІАТІ, ніж особи жіночої статі з G/G-генотипом. Також було показано, що чоловіки-гомозиготи за мінорним А-алелем за зазначеним SNP мають у 2,2 раза вищий ризик настання ішемічного інсульту, ніж в осіб цієї статі з

генотипом G/G. Поряд із цим була виявлена асоціація поліморфного сайту Arg325Gln гена *GGCX* з інфарктом головного мозку в жінок. Установлено, що генотип T/T підвищує імовірність розвитку ІАТІ, тоді як гетерозиготний С/Т-генотип в осіб цієї статі призводить до дворазового зниження ризику настання інсульту. При цьому статистична значущість цих результатів зберігалась і після врахування інших факторів ризику атеросклерозу.

Статеві особливості впливу поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К на розвиток атеросклерозу та його ускладнень були показані в роботах й інших авторів. Так, Wang et al. виявили, що ризик ішемічного інсульту та інфаркту міокарда у чоловіків-носіїв мінорного С-алеля за поліморфним сайтом T2255C гена *VKORC1* вищий, ніж відповідний ризик у жінок, які є носіями цього самого алеля [250]. Дослідження, проведені в українській популяції, продемонстрували зв'язок T2255C-поліморфного локусу гена *VKORC1* з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб чоловічої статі, у той час як у жінок цей генетичний маркер не асоційований з ІАТІ [85]. Крім того, низкою досліджень були виявлені статеві відмінності в дозуванні оральних антикоагулянтів серед осіб з однаковими генотипами за G-1639A-, C1173T-, G3730A-поліморфізмами гена *VKORC1* та поліморфними локусами Arg325Gln і Arg406Arg гена *GGCX* [106, 108, 185, 226, 255].

На сьогодні вважається, що надмірна маса тіла є одним із найнебезпечніших факторів ризику виникнення та розвитку серцево-судинних захворювань, включаючи гострі та хронічні розлади мозкового кровообігу [30]. Результати широкомасштабних досліджень показали, що особи з підвищеним ІМТ майже удвічі частіше хворіють на ішемічний інсульт, ніж особи з нормальною вагою [39]. Поряд із цим доведено, що в пацієнтів із нормальним ІМТ ризик інфаркту головного мозку на 64 % нижчий, ніж в осіб із ожирінням [101].

Після розподілу представників обох груп порівняння на осіб із нормальним та підвищеним ІМТ ми встановили, що в осіб із надмірною вагою існує зв'язок між G-1639A-поліморфізмом промотору гена *VKORC1* та

розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту. Виявлено, що в пацієнтів з ІМТ ≥ 25 кг/м², які є носіями мінорного А-алеля, ризик ІАТІ у 2,4 раза вищий, ніж у власників генотипу G/G.

Група дослідників Du et al., вивчаючи вплив поліморфних сайтів генів *VKORC1* та *CD-14* на розвиток цереброваскулярних захворювань серед населення Китаю, показали, що ІМТ у межах 20–25 кг/м² є вагомим протективним фактором щодо ішемічного інсульту. Поряд із цим асоціація зазначених поліморфізмів із розвитком інфаркту головного мозку окремо в осіб із нормальною вагою була відсутньою [248]. Натомість дослідження в українській популяції виявили значущий вплив T2255C-поліморфного локусу гена *VKORC1* на розвиток ІАТІ в осіб із ІМТ < 25 кг/м². Було показано, що в носіїв мінорного С-алеля з нормальною масою тіла ризик ішемічного атеротромботичного інсульту в 4 рази вищий, між в осіб з генотипом Т/Т [85]. Крім того, Tavridou et al., досліджуючи зв'язок G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з деякими факторами ризику серцево-судинних захворювань, не виявили різниці в показниках ІМТ в осіб із різними генотипами за вказаних поліморфним локусом [56]. Fodor et al. під час вивчення впливу С1173Т-поліморфного сайту гена *VKORC1* на щільність кісткової тканини встановили, що особи з Т/Т-генотипом мають достовірно нижчі значення ІМТ, якщо порівнювати з носіями С-алеля [195].

Беззаперечним є факт того, що артеріальна гіпертензія є самостійним та сильним фактором ризику серцево-судинної патології. Відомо, що зростання величини систолічного АТ на кожні 20 мм рт. ст. призводить до подвоєння ризику смертності від гострого коронарного синдрому та інсультів різного типу [6]. Крім того, результати звітів ВООЗ свідчать про те, що близько 85 % осіб, що перенесли інсульт, мають артеріальну гіпертензію [146].

У нашій роботі був проведений аналіз асоціації поліморфних сайтів генів циклу вітаміну К із розвитком ІАТІ окремо серед осіб без та з артеріальною гіпертензією. Було встановлено, що G-1639A-поліморфізм гена *VKORC1* пов'язаний з ішемічним інсультом в осіб з АГ. У носіїв мінорного

A-алеля ризик настання цієї недуги був у 2,4 раза вищий, ніж у гомозигот G/G, а гомозиготи за мінорним алелем були в 4 рази більш схильні до розвитку інфаркту головного мозку, ніж гомозиготи за основним алелем. Значущість наведених результатів зберігалась і після поправки на стать, вік пацієнта, його ІМТ та наявність звички паління. Поряд із цим у гомозигот T/T за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX*, які страждали на артеріальну гіпертензію, ризик ІАТІ був у 3,7 раза вищий, ніж у носіїв основного С-алеля. Однак в осіб із нормальними показниками АТ гетерозиготний генотип С/Т мав протективне значення і призводив до зменшення ризику ішемічного інсульту більше ніж утричі, якщо порівнювати з власниками інших генотипів. Достовірність цих даних не втрачалась і після поправки на інші фактори ризику.

Подібні результати були одержані під час вивчення впливу поліморфних варіантів генів системи матриксного Gla-протеїну на розвиток атеросклерозу та його ускладнень серед населення України. Harbuzova et al. установили, що ризик ІАТІ в пацієнтів із нормальним АТ, що є носіями мінорного алеля 325Gln (Arg325Gln SNP гена *GGCX*), у 5 разів вищий, ніж у гомозигот Arg/Arg [44]. Окрім цього, в іншій роботі показано, що в осіб з артеріальною гіпертензією, які є власниками T/C- та C/C-генотипів за поліморфним сайтом T2255C гена *VKORC1*, ризик гострого коронарного синдрому в 2,9 раза вищий, ніж у C/C-гомозигот [3]. Поряд із цим у грецькій популяції не виявлено зв'язку між G-1639A-поліморфізмом промотору гена *VKORC1* та артеріальною гіпертензією у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу [56].

Як повідомляється, на сьогодні на планеті палять близько 1,1 мільярда людей, що призводить до стрімкого зростання кількості випадків серцево-судинних захворювань, пухлин різної локалізації та бронхообструктивних патологій [152]. За даними ВООЗ, паління обумовлює близько 30 % від загальної кількості всіх випадків смертності від патології серцево-судинної системи [257]. Також відомо, що ризик ішемічного інсульту в осіб зі звичкою

палити приблизно в 3 рази вищий, ніж в осіб, які не палять, та істотно корелює з інтенсивністю куріння [120].

У нашій роботі зв'язок досліджуваних поліморфізмів генів циклу вітаміну К з ішемічним атеротромботичним інсультом був виявлений лише серед тих осіб, які не палять. Такі результати можуть бути пояснені тим, що паління, будучи самостійним фактором ризику серцево-судинних захворювань, спричиняє розвиток атеросклерозу та його ускладнень незалежно від генетичного поліморфізму ферментів циклу вітаміну. Проте в підгрупі осіб, які не палять, було показано, що носії мінорного алеля А за G-1639A локусом гена *VKORC1* мають у 2,4 раза, а гомозиготи за мінорним алелем – у 4 рази вищий ризик розвитку ІАТІ порівняно із гомозиготами за основним алелем. Достовірність таких результатів зберігалась і після врахування віку, статі, ІМТ пацієнта та наявності в нього АГ. Щодо поліморфного локусу С1173Т гена *VKORC1*, то гомозиготи Т/Т без звички паління мали в 2,4 раза вищу ймовірність настання ішемічного інсульту, ніж гомозиготи С/С. Поряд із цим аналіз за Arg406Arg-поліморфізмом гена *GGCX* виявив, що у гомозигот за мінорним алелем (Т/Т-генотип), які не палять, ризик інфаркту головного мозку в 8,4 рази вищий, ніж у носіїв основного С-алеля (С/С- та С/Т-генотипи).

У роботі Shyu et al. показано, що протективний ефект основних поліморфних варіантів генів *GGCX*, *VKORC1*, *NQO1* щодо розвитку судинного ураження головного мозку більшою мірою виявляв себе в осіб, які не палять та не вживають спиртних напоїв [113]. Проте дослідження впливу поліморфізмів Т2255С (ген *VKORC1*) та Arg325Gln (ген *GGCX*) на розвиток ускладнень атеросклерозу в українській популяції не виявили зв'язку вказаних локусів з ішемічним атеротромботичним інсультом та інфарктом міокарда окремо як серед курців, так і серед тих, хто не палить [2, 44]. Разом із тим Tavridou et al. не виявили залежності між генотипом за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* та палінням серед населення Греції [56].

На сьогодні вважається, що гаплотипний аналіз є більш ефективним у пошуку генетичних детермінант поширених мультифакторіальних хвороб, ніж аналіз поліморфізму поодиноких нуклеотидів [26]. Проте також відомо, що для створення гаплотипів необхідно використовувати лише ті поліморфні сайти, які знаходять у нерівноважному зчепленні. Тому спочатку нами був проведений розрахунок LD між усіма досліджуваними поліморфними варіантами, у результаті чого міцне нерівноважне зчеплення було виявлено лише між парою локусів G-1639A/C1173T гена *VKORC1* ($D = 0,809$; $r^2 = 0,518$), що узгоджується з даними інших авторів [21, 43, 250]. Це спонукало нас до проведення розрахунку частот гаплотипів за зазначеними SNP та пошуку їх зв'язку з ішемічним інсультом. Було встановлено, що особи з гаплотипами -1639G/1173T та -1639A/1173C мають підвищений ризик розвитку ІАТІ, натомість -1639G/1173C-гаплотип пов'язаний зі зменшенням ризику цієї недуги. Крім того, нами за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності був проведений аналіз поєднаного впливу поліморфних сайтів генів циклу вітаміну К та інших відомих факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ та створення на основі їх класифікаційної моделі. Серед усіх можливих моделей найбільшу прогностичну здатність мала та, що включала поліморфний сайт G-1639A гена *VKORC1* та артеріальну гіпертензію. Таким чином, було встановлено, що поєднання в одній особі АГ та носійства мінорного А-алеля за вказаним поліморфним локусом є значимим предиктором високого ризику настання ішемічного атеротромботичного інсульту.

Дослідження поєднаного впливу різних поліморфних сайтів гена *VKORC1* на розвиток ішемічного інсульту було виконане і в інших популяціях. Так, аналіз асоціації гаплотипів гена *VKORC1* із ІАТІ серед населення Китаю показав, що гаплотип -1639G-1173C пов'язаний із високим ризиком розвитку ішемічного інсульту, тоді як -1639A-1173T-варіант має протективний ефект [43]. У роботі Wang et al. було ідентифіковано гаплотипний блок у гені *VKORC1*, що включає п'ять основних некодуючих

SNP (G-1639A, C1173T, C1542G, T2255C і G3730A) із високим LD [250]. Автори продемонстрували, що серед населення Китаю гаплотип G-C-G-C-A є вагомим фактором ризику розвитку інфаркту головного мозку, ішемічної хвороби серця та розширення аорти. Поряд із цим результати дослідження в США показали відсутність зв'язку гаплотипів гена *VKORC1* із тромбозом вен, артерій головного мозку та серця [71]. Також не виявлено впливу гаплотипів гена *VKORC1* на розвиток різних підтипів ішемічного інсульту серед населення Бельгії та Німеччини [139, 209]. На додаток, результати досліджень, проведені в нідерландській та японській популяціях, не показали асоціації різних гаплотипів генів *VKORC1* та *GGCX* із розвитком венозного тромбозу [121, 218]. Зв'язок цих гаплотипів із вмістом вітамін-К-залежних факторів згортання крові знайдений також не був.

Для того щоб пояснити одержаний у нашому дослідженні зв'язок поліморфізмів генів циклу вітаміну К із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту необхідно насамперед з'ясувати сутність цих нуклеотидних замін та їх можливий вплив на функціонування тих білків, до структури генів яких вони належать.

Однонуклеотидний поліморфізм Arg406Arg (rs2592551) розміщений у 9-му екзоні гена *GGCX* та являє собою заміну цитозину на тимін у позиції 8527, що однак не приводить до заміни амінокислоти у 406-му положенні поліпептидного ланцюга зрілого білка. За останні роки опублікована низка робіт, в яких чітко продемонстрований вплив цього поліморфного локусу на дозування варфарину в японській [125], північно-американській популяціях [160] та серед китайських пацієнтів із миготливою аритмією [51]. Показано, що носії мінорного алеля за вказаних поліморфізмом потребують меншої дози, порівняно з гомозиготами за основним алелем. Механізм, що лежить в основі такого впливу, наразі не з'ясований. Можемо припустити, що заміна цитозину на тимін, яка призводить до зміни кодуєчого кодону CGC на CGT, хоча і не викликає зміни структури протеїну, проте впливає на швидкість його трансляції, а отже, змінює сумарну активність *GGCX* у клітині. Також

не відкидається можливість того, що даний генетичний локус може перебувати в нерівноважному зчепленні з іншими поліморфними сайтами гена γ -глутамілкарбоксилази.

Поліморфний сайт C1173T (rs9934438) розташований у першому інтроні гена *VKORC1* та призводить до заміни цитозину на тимін у 1173-й позиції. Низкою досліджень продемонстровано, що зазначений SNP знаходиться у міцному LD із G-1639A-поліморфним локусом гена *VKORC1* [21, 43, 250], що було показано і в нашій роботі. Поліморфізм G-1639A (rs9923231) знаходиться у другому нуклеотиді E-боксу (CA/GGGTG) промотору гена *VKORC1* та спричинює заміну гауніну на аденін в -1639-му положенні. Така нуклеотидна конверсія призводить до перебудови E-боксу (з CGGGTG на CAGGTG), що дозволяє приєднуватися до нього репресивним білкам [193]. Таким чином, вказаний поліморфний варіант призводить до змін активності промотору *VKORC1* і спричинює пригнічення утворення мРНК *VKORC1* та експресії ферменту. Відповідно до цього у кількох працях показано, що в тканинах тварин із генотипами G-1639A/C1173T та A-1639A/T1173T рівень експресії мРНК вітамін-К-епоксидредуктази був нижчим порівняно з носіями генотипів G-1639G/C1173C [20, 193].

Вищенаведене дозволяє припустити, що пригнічення відновлення вітаміну-К-епоксиду в носіїв -1639A- та 1173T-алелів за поліморфними сайтами гена *VKORC1* та зменшення сумарної активності γ -глутамілкарбоксилази у носіїв мінорного T-алеля за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* може призводити до недостатності γ -карбоксилювання вітамін-К-залежних білків і таким чином знижувати їх активність. Група зазначених протеїнів є дуже гетерогенною та включає в себе білки, що задіяні в різноманітних процесах як усередині клітин, так і в позаклітинному середовищі живих організмів. Саме тому зміна їх активності може приводити до цілої низки різних порушень.

З одного боку, зменшення активності вітамін-К-залежних факторів згортання крові (II, VII, IX, X) може призводити до пригнічення коагуляції

крові, а отже, і до зменшення ризику тромбоутворення. Іншими словами, буде зімітований ефект варфарину та інших оральних антикоагулянтів, механізм дії яких полягає у пригніченні функціонування *VKORC1*. Так, дослідницька група Shyu et al. вивлений протективний ефект алелів -1639A (поліморфізм G-1639A гена *VKORC1*) та 325Arg (поліморфізм Arg325Gln гена *GGCX*) щодо розвитку ішемічного інсульту пояснила тим, що носії зазначених варіантів мали знижену концентрацію факторів згортання крові, що в кінцевому підсумку привело до зменшення імовірності тромбоутворення, а значить, і до редукції ураженості інсультом [113]. В іншій роботі, знайдену асоціацію між -1639G-алелем за поліморфізмом G-1639A, що обумовлює високий рівень продукції мРНК гена *VKORC1*, автори пов'язали зі зменшеною чутливістю до кумаринових антикоагулянтів та підвищеним ризиком тромбозу в носіїв наведеного алеля [43].

Останніми роками все більшої уваги приділяється періостину та GAS6 – вітамін-К-залежним білкам, що задіяні у процесах гемостазу та розвитку атеросклеротичної бляшки. Blostein et al. продемонстрували, що пацієнти з високою концентрацією GAS6 у крові мають достовірно вищий ризик розвитку венозного тромбозу, ніж особи з низьким вмістом цього протеїну [90]. Поряд із цим було показано, що у щурів, нокаutowаних за геном *GAS6*, практично не розвивається летальний тромбоемболізм, що свідчить про протромботичну роль вказаного вітамін-К-залежного білка [79]. Також виявлено, що виключення гена *GAS6* у щурів, що вже нокаutowані за геном *APOE*, призводить до пригнічення процесів запалення в атеросклеротичній бляшці та зростання її стабільності [109]. Остання характеризувалася підвищеною кількістю ГМК і колагену та зменшенням числа макрофагів, порівняно з відповідною бляшкою щурів, в яких інактивованій лише один ген *APOE*. Більше того, було показано, що генотип A/A за поліморфним сайтом с.834 + 7G>A гена *GAS6* асоційований зі зменшенням ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту [55]. Щодо періостину, то Schwanekamp et al. виявили, що щури, в яких були

«вимкнені» гени *APOE* та *POSTN* мали значно зменшений розмір атеросклеротичної бляшки та меншу кількість макрофагів у ній, якщо порівнювати зі щурами, нокаутованими лише за геном *APOE* [80]. Таким чином, можна припустити, що зниження активності *GAS6* та періостину внаслідок поліморфізму генів циклу вітаміну К може пригнічувати тромбогенез і ріст атеросклеротичної бляшки, що в кінцевому підсумку буде зменшувати ризик ІАТІ. Доказом наведеної гіпотези можуть служити результати досліджень, в яких виявлено зв'язок поліморфних варіантів генів *VKORC1* та *GGCX* зі зменшеним ризиком венозної тромбоемболії [243, 247] і відсутність асоціації поліморфізмів зазначених генів із розвитком ішемічного інсульту [50, 209] та синдрому Бехчета [249].

З другого боку, зменшення активності інших вітамін-К-залежних білків може мати протилежні ефекти. Kimura et al., проаналізувавши зв'язок між поліморфними варіантами генів циклу вітаміну К та активністю протеїнів S і C серед населення Японії, виявили, що активність останнього була достовірно меншою у гомозигот за мінорним алелем за поліморфізмом G3730A гена *VKORC1* порівняно з носіями основного алеля [177]. Поряд із цим значною кількістю праць останніх двадцяти років показано, що такі вітамін-К-залежні білки, як MGP і GRP, відіграють значну роль у захисті судинної стінки від мінералізації [114, 181, 204], а їх дисфункція проявляє себе масивним відкладанням кальцію в медії артерій та в атеросклеротичній бляшці [115, 147, 212]. Окрім цього відомо, що вітамін-К-залежний протеїн остеокальцин у γ -карбоксілюваній формі утворює зв'язки із гідроксіапатитом у кістковому позаклітинному матриксі кісток, тоді як некарбоксілюваний варіант цього білка виконує роль регулятора метаболізму глюкози [91]. Група Idelevich et al. показала, що остеокальцин активує в ГМК судин процеси утилізації глюкози та сприяє остеохондрогенній диференціації цих клітин [128]. Це дозволяє припустити, що недостатність γ -карбоксілювання протеїну С, протеїну S, протеїну Z, MGP, GRP та остеокальцину у носіїв мінорних алелів за досліджуваними в

нашій роботі поліморфними сайтами генів циклу вітаміну К може призводити до пригнічення активності перелічених білків. Наслідком цього може бути підвищений ризик тромбоутворення, мінералізації артерій та атеросклеротичної бляшки, що є важливими складовими патогенезу ішемічного атеротромботичного інсульту.

Відповідно до вищенаведеного Teichert et al. показали, що Т-алель за С1173Т-поліморфним локусом гена *VKORC1* асоційований із підвищеним ризиком кальцифікації аорти [241]. Tavridou et al. виявили зв'язок між поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* та товщиною інтими-медії сонних артерій у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу [56]. Таку кореляцію автори пояснили більш вираженою кальцифікацією судин в осіб із -1639А-алелем через зниження в них вмісту карбоксильованого MGP. Також доказом гіпотези про вплив поліморфних варіантів генів *GGCX* та *VKORC1* на розвиток атеросклерозу та його ускладнень можуть служити результати багатьох досліджень, в яких показана асоціація поліморфізмів генів циклу вітаміну К із розвитком інфаркту головного мозку [43, 144, 250] та ішемічної хвороби серця [112, 250, 252].

Узагальнювальна схема, в якій відображені можливі шляхи впливу різних алелей за поліморфними сайтами генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту, наведена на рис. 4.1.

Таким чином, випливає, що в одних випадках генетичний поліморфізм *GGCX* та *VKORC1* може призводити до зниження ризику тромбоутворення та атеросклерозу, а в інших – підвищувати ймовірність тромбозу та атерогенезу, сприяючи розвитку серцево-судинних захворювань (як було показано в нашій роботі). Одним із пояснень цього може бути поширений дефіцит вітаміну К серед представників багатьох популяцій [60]. У такій ситуації транспортні системи забезпечують доставку філохінону до печінки для підтримання коагуляції крові. В той час як позапечінкові тканини, в яких синтезуються менш важливі Gla-білки, не одержують вітаміну К (відповідно до теорії сортування МакКана та Еймса [151]). За таких умов зниження

активності білків циклу вітаміну К внаслідок генетичного поліморфізму посилює дефіцит вітаміну К у позапечінкових тканинах та компенсується надходженням вітаміну К у печінку.

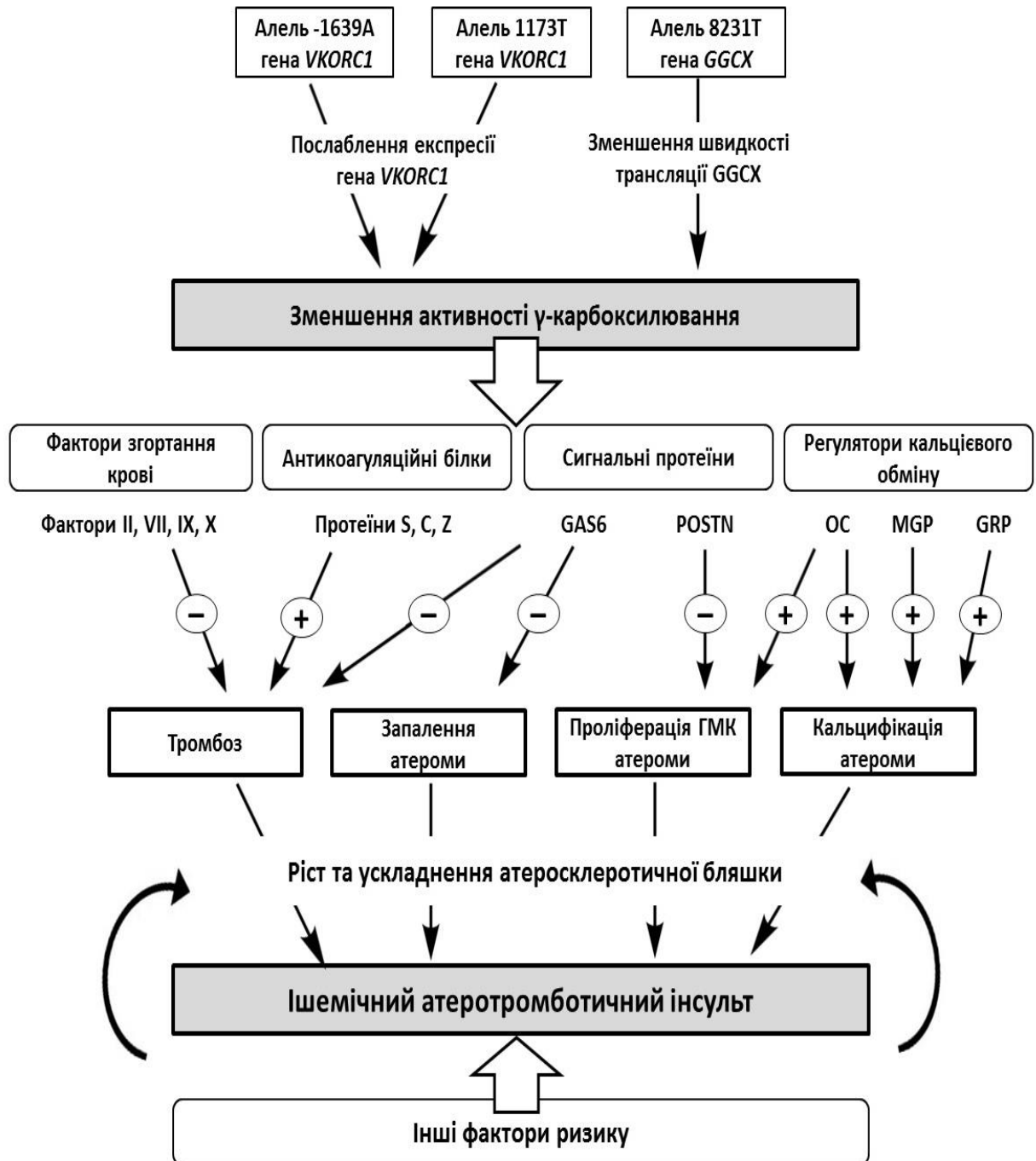


Рисунок 4.1 – Можливий вплив поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту. GAS6 – білок, що специфічно затримує ріст β; POSTN – періостин; OC – остеокальцин; MGP – матриксний Gla-протеїн; GRP – Gla-rich-протеїн; ГМК – гладкі м'язові клітини

Підсумовуючи, можна сказати, що участь поліморфізмів генів циклу вітаміну К у розвитку атеросклерозу та його фатальних ускладнень, зокрема ішемічного атеротромботичного інсульту, є беззаперечною. Проте значна гетерогенність вітамін-К-залежних білків, функціонування яких багато в чому залежить від активності процесів γ -карбоксилювання в циклі вітаміну К, зумовлює розмаїття фенотипових проявів нуклеотидної варіабельності генів γ -глутамілкарбоксилази та вітамін-К-епоксидредуктази, сприяючи розвиткові атеротромботичних ускладнень в одних випадках і запобігаючи їм – в інших. Подальші роботи, спрямовані на пошук зв'язку поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К та генів самих вітамін-К-залежних білків із розвитком ІАТІ, а також на виявлення нових генетичних маркерів ішемічного інсульту, нададуть можливість поглибити знання про патогенез цього захворювання та дозволять покращити методи його прогнозування, молекулярної діагностики та персоніфікованого лікування.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нові результати, що вирішують наукове завдання, суть якого полягає у виявленні зв'язку поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб, що мають різні фактори його ризику.

1. Визначені частоти мінорних алелів за поліморфними варіантами генів циклу вітаміну К в осіб без ішемічного інсульту знаходяться у відповідності до більшості європейських популяцій і становлять 0,37 для G-1639A, 0,33 – для C1173T-поліморфізмів гена *VKORC1*, та 0,23 – для Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX*. Існує різниця в розподілі алельних варіантів між хворими з ІАТІ та особами контрольної групи за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* ($P = 0,027$), тоді як співвідношення різних варіантів генотипу за поліморфізмами C1173T (ген *VKORC1*) та Arg406Arg (ген *GGCX*) достовірно не відрізняється між групами порівняння ($P = 0,178$ і $P = 0,113$ відповідно).

2. Однонуклеотидний поліморфізм G-1639A промоторної ділянки гена *VKORC1* є вагомим предиктором ішемічного атеротромботичного інсульту та незалежним фактором його ризику. У носіїв мінорного А-алеля ймовірність настання ІАТІ значущо вища, ніж у гомозигот за основним G-алелем ($OR_{\text{попр}} = 2,138$; $P_{\text{попр}} = 0,015$).

3. Поліморфний сайт C1173T першого інтрона гена *VKORC1* не асоційований із ризиком розвитку ішемічного інсульту атеротромботичного генезу ($P_{\text{попр}} = 0,054$).

4. Існує зв'язок між поліморфізмом Arg406Arg дев'ятого екзона гена *GGCX* та ішемічним атеротромботичним інсультом. Ризик розвитку ІАТІ у гомозигот за мінорним Т-алелем вищий, ніж у носіїв основного С-алеля ($OR_{\text{спост}} = 3,117$; $P_{\text{спост}} = 0,047$).

5. Вплив досліджуваних генетичних чинників на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту залежить від статі. Жінки, які є носіями мінорного А-алеля (G-1639A-поліморфізм гена *VKORC1*), мають вищий

ризик розвитку ІАТІ, ніж особи жіночої статі з G/G-генотипом ($OR_{\text{попр}} = 2,848$; $P_{\text{попр}} = 0,038$). У жінок-гетерозигот C/T (поліморфізм Arg406Arg гена *GGCX*) ризик настання ішемічного інсульту достовірно менший, ніж у носіїв інших генотипів ($OR_{\text{попр}} = 0,474$; $P_{\text{попр}} = 0,046$).

6. В осіб з $IMT \geq 25$ кг/м², які є носіями мінорного А-алеля за поліморфним локусом G-1639A гена *VKORC1*, ризик ІАТІ вищий, ніж у гомозигот за основним алелем ($OR_{\text{попр}} = 2,391$; $P_{\text{попр}} = 0,016$). Гомозиготи за мінорним А-алелем (G-1639A-поліморфізм гена *VKORC1*) з артеріальною гіпертензією мають вищий ризик ішемічного атеротромботичного інсульту, ніж гомозиготи G/G ($OR_{\text{попр}} = 4,029$; $P_{\text{попр}} = 0,029$). В осіб без артеріальної гіпертензії генотип C/T (Arg406Arg-поліморфізм гена *GGCX*) призводить до зменшення ризику інфаркту головного мозку, якщо порівнювати з C/C- та T/T-генотипами ($OR_{\text{попр}} = 0,287$; $P_{\text{попр}} = 0,030$). Серед осіб, які не палять, носії мінорного алеля А за G-1639A-локусом гена *VKORC1* мають вищий ризик розвитку ІАТІ порівняно із гомозиготами G/G ($OR_{\text{попр}} = 2,412$; $P_{\text{попр}} = 0,013$).

7. Гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C за поліморфізмами G-1639A і C1173T гена *VKORC1* пов'язані з підвищеним ризиком розвитку ІАТІ ($OR = 3,813$; $P = 0,010$ і $OR = 2,189$; $P = 0,011$ відповідно), а гаплотип -1639G/1173C має протективне значення ($OR = 0,548$; $P < 0,001$). Аналіз поєднаного впливу поліморфних сайтів генів циклу вітаміну К та інших відомих факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ дав можливість створити класифікаційну модель, що включає поліморфний сайт G-1639A гена *VKORC1* та артеріальну гіпертензію (прогностична значущість 61 % за методом MDR, $P = 0,022$). Поєднання в однієї особи АГ та носійства мінорного А-алеля за зазначеним поліморфним сайтом є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аналіз впливу поліморфізму С677Т гена N5, N10-метилентетрагідрофолатредуктази на розвиток ішемічного інсульту у людей з різними факторами його ризику / В. Ю. Гарбузова, О. В. Полоніков, Д.О. Строй [та співавт.] // Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, № 2. – С. 18–24.
2. Ассоциация аллельных полиморфизмов генов системы матричного Gla-протеина с острым коронарным синдромом в украинской популяции / В. Ю. Гарбузова, Д. А. Строй, В. Е. Досенко [и соавт.] // *Biopolym. Cell.* – 2015. – № 31 (1). – Р. 46–56.
3. Гарбузова В. Ю. Аналіз зв'язку T2255C поліморфізму гена вітамін К-епоксидоредуктази з гострим коронарним синдромом в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском / В. Ю. Гарбузова // Клінічна та експериментальна патологія. – 2014. – Т. XIII, № 4 (50). – С. 27–31.
4. Зозуля І. С. Епідеміологія цереброваскулярних захворювань в Україні / І. С. Зозуля, А. І. Зозуля // *Укр. мед. часопис.* – 2011. – Т. 5 (85). – С. 38–41.
5. Клінічне значення поліморфного варіанта G-1639A гена VKORC1 в індивідуалізації терапії варфарином / І. В. Малярчук, Н. Г. Горovenko, О. А. Крикунов, А. Р. Бабочкіна // *Український кардіологічний журнал.* – 2014. – № 2. – С. 100–105.
6. Купчинская Е. Г. Коррекция факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных артериальной гипертензией / Е. Г. Купчинская, И. В. Лизогуб, О. А. Волошина // Газета «Здоров'я України». – 2007. – № 21/1. – С. 82–83.
7. Курнацький В.М. Медико-соціальні аспекти цереброваскулярних хвороб в Україні / В. М. Курнацький, І. Л. Ревенько // *Український кардіологічний журнал.* – 2011. – Т. 1 (3). – С. 86–92.

8. Міщенко Т. С. Епідеміологія захворювань нервової системи в Україні / Т. С. Міщенко // Український вісник психоневрології. – 2015. – Т. 23, вип. 3 (84). – С. 151–152.
9. Олешко Т. Б. Аналіз зв'язку Lys198Asn поліморфних варіантів гена ендотеліну-1 (EDN-1) з ішемічним атеротромботичним інсультом / Т. Б. Олешко, Д. Ю. Свириденко, В. Ю. Гарбузова // Клінічна та експериментальна патологія. – 2016. – №1 (55). – С. 99–103.
10. Рання реабілітація хворих з інсультом в умовах неврологічного відділення / М. В. Тарарощенко, Н. В. Бабкіна, Д. О. Алійник [та співавт.] // Український неврологічний журнал. – 2015. – № 2. – С. 77–81.
11. Ревенько І. Л. Епідеміологія інсульту в Україні / І. Л. Ревенько // Запорозький медичний журнал. – 2010. – Т. 12 (3). – С. 42–47.
12. A C1173T Dimorphism in the VKORC1 Gene Determines Coumarin Sensitivity and Bleeding Risk / P. H. Reitsma, J. F. Heijden, A. P. Groot [et al.] // PLoS Med. – 2005. – Vol. 2. – P. 312–316.
13. A cellular system for quantitation of vitamin K cycle activity: structure-activity effects on vitamin K antagonism by warfarin metabolites / J. A. Haque, M. G. McDonald, J. D. Kulman, A. E. Rettie // Blood. – 2014. – Vol. 123 (4). – P. 582–589.
14. A conformational investigation of propeptide binding to the integral membrane protein gamma-glutamyl carboxylase using nanodisc hydrogen exchange mass spectrometry / C. H. Parker, C. R. Morgan, K. D. Rand [et al.] // Biochemistry. – 2014. – Vol. 53. – P. 1511–1520.
15. A conserved region of human vitamin K-dependent carboxylase between residues 393 and 404 is important for its interaction with the glutamate substrate / V. P. Mutucumarana, F. Acher, D. L. Straight [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 46488–46493.
16. A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin-K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Gln) is associated with bone mineral

density in elderly Japanese women / H. Kinoshita, K. Nakagawa, K. Narusawa [et al.] // *Bone*. – 2007. – Vol. 40. – P. 451–456.

17. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk / A. D. Sniderman, K. Williams, J. H. Contois [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes*. – 2011. – Vol. 4. – P. 337–345.

18. A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors / B. Brenner, B. Sanchez-Vega, S. M. Wu [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – P. 4554–4549.

19. A new model for vitamin K-dependent carboxylation: the catalytic base that deprotonates vitamin K hydroquinone is not Cys but an activated amine / M. A. Rishavy, B. N. Pudota, K. W. Hallgren [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 13732–13737.

20. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity / H. Y. Yuan, J. J. Chen, M. T. Lee [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2005. – Vol. 14 (13). – P. 1745–1751.

21. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin / G. D'Andrea, R. L. D'Ambrosio, P. D. Perna [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105 (2). – P. 645–649.

22. A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase / J. Tie, S. M. Wu, D. Jin [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – P. 973–978.

23. Abnormalities of development and hemostasis in gammacarboxylase deficient mice / A. Zhu, R. Raymond, X. Zheng [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – P. 152–156.

24. ACE I/D polymorphism in Korean patients with ischemic stroke and silent brain infarction / S. H. Hong, H. M. Park, J. Y. Ahn [et al.] // *Acta Neurol. Scand*. – 2008. – Vol. 117. – P. 244–249.

25. Ahmed M. Polymorphism in Endothelin-1 Gene: An Overview / M. Ahmed, A. Rghigh // *Curr. Clin. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 11 (3). – P. 191–210.

26. Akey J. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? / J. Akey, L. Jin, M. Xiong // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 9. – P. 291–300.

27. Alison A. M. Ritchie. Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene – gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies / A. M. Alison, D. Marylyn // *Human genomics.* – 2006. – Vol. 2, №5. – P. 318–328.

28. Allelic polymorphism in the promoter (T–786→C), but not in exon 7 (G894→T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population / V. E. Dosenko, V. Yu. Zagoriy, Ya. M. Lutay [et al.] // *Exp. Clin. Cardiol.* – 2006. – Vol. 11 (1). – P. 11–13.

29. Alu distribution and mutation types of cancer genes / W. Zhang, A. Edwards, W. Fan [et al.] // *BMC Genomics.* – 2011. – Vol. 12. – P. 157–161.

30. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics – 2009 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee / D. Lloyd-Jones, R. Adams, M. Carnethon [et al.] // *Circulation.* – 2009. – Vol. 119, № 3. – P. 480–486.

31. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics – 2011 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee / D. Lloyd-Jones, R. Adams, M. Carnethon [et al.] // *Circulation.* – 2011. – Vol. 129, № 5. – P. 567–573.

32. Angiotensin converting enzyme 2 and atherosclerosis / Y. Wang, C. Tikellis, M. C. Thomas, J. Golledge // *Atherosclerosis.* – 2013. – Vol. 226 (1). – P. 3–8.

33. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and stroke in type 2 diabetic patients in Taiwan / C. H. Tseng, C. P. Tseng, C. K. Chong [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 37. – P. 483–491.

34. Angiotensin-Converting Enzyme in Smooth Muscle Cells Promotes Atherosclerosis-Brief Report / X. Chen, D. A. Howatt, A. Balakrishnan [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2016. – Vol. 36 (6). – P. 1085–1089.

35. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: a meta-analysis / E. Zintzaras, G. Raman, G. Kitsios, J. Lau // *Arch. Intern. Med.* – 2008. – Vol. 168. – P. 1077–1189.

36. Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Contributes to Ischemic Stroke Risk: A Meta-Analysis of 50 Case-Control Studies / Z. Zhang, G. Xu, D. Liu [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(10). – e46495.

37. Angiotensinogen gene polymorphism and ischemic stroke in East Asians: A meta-analysis / S.Wang, R. Zeng, L. Lei, J. Huang // *Neural. Regen. Res.* – 2013. – Vol. 8 (13). – P. 1228–1235.

38. Angiotensinogen polymorphism and ischemic stroke risk / H. Bao, J. J. Hao, Yu. M. Yang [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 8 (8). – P. 12914–12920.

39. Antillon D. No time to 'weight': the link between obesity and stroke in women / D. Antillon, A. Towfighi // *Womens Health (Lond).* – 2011. – Vol. 7 (4). – P. 453–463.

40. Apolipoprotein E and first-ever ischaemic stroke in Greek hospitalized patients / G. Giassakis, S. Veletza, N. Papanas [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2007. – Vol. 35. – P. 127–133.

41. Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: systematic review and meta-analysis of 14,015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60,883 individuals / T. A Khan, T. Shah, D. Prieto [et al.] // *Int. J. Epidemiol.* – 2013. – Vol. 42 (2). – P. 475–492.

42. Ashjazadeh N. Evaluation of Homocysteine Level as a Risk Factor among Patients with Ischemic Stroke and Its Subtypes / N. Ashjazadeh, M. Fathi, A. Shariat // *Iran J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 38 (3). – P. 233–239.

43. Association between VKORC1 gene polymorphisms and ischemic cerebrovascular disease in Chinese Han population / H. Zhang, L. Yang, Q. Feng [et al.] // *Journal of Molecular Neuroscience.* – 2014. – Vol. 53 (2). – P. 166–170.

44. Association of allelic polymorphisms of genes matrix Gla-protein system with ischemic atherothrombotic stroke / V. Y. Garbuzova, D. A. Story, V. E. Dosenko [et al.] *Fiziologichnyi zhurnal.* – 2015. – Vol. 61 (1). – P. 19–27.

45. Association of apolipoprotein E genotype and cerebrovascular disease risk factors in a Turkish population / N. Tasdemir, Y. Tamam, R. Toprak [et al.] // *Int. J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 118. – P. 1109–1129.

46. Association of apolipoprotein E polymorphism with ischemic stroke subtypes in Taiwan / C. L. Lai, C. K. Liu, R. T. Lin, C. T. Tai // *Kaohsiung. J. Med. Sci.* – 2007. – Vol. 23. – P. 491–497.

47. Association of C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR gene) with ischemic stroke: a meta-analysis / A. Kumar, P. Kumar, M. Prasad [et al.] // *Neurol. Res.* – 2015. – Vol. 37 (7). – P. 568–577.

48. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with early-onset ischemic stroke in South Indians / V. Majumdar, D. Nagaraja, N. Karthik, R. Christopher // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2010. – Vol. 17 (1). – P. 45–53.

49. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with ischemic cerebrovascular disease / X. J. Meng, L. X. Xu, Q. Lin [et al.] // *Chinese Journal of Gerontology.* – 2012. – Vol. 32. – P. 1567–1569.

50. Association of Functional VKORC1 Promoter Polymorphism with Occurrence and Clinical Aspects of Ischemic Stroke in a Greek Population / G. Ragia, S. Marousi, J. Ellul [et al.] // *Disease Markers.* – 2013. – Vol. 35 (6). – P. 641–646.

51. Association of GGCC gene polymorphism with warfarin dose in atrial fibrillation population in Xinjiang / X. Kamali, M. Wulasihan, Y. Yang [et al.] // *Lipids in Health and Disease*. – 2013. – Vol. 2 (149). – P. 1–5.

52. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism with ischemic stroke in the Eastern Chinese Han population / Q. Q. Lv, J. Lu, H. Sun, J. S. Zhang // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14 (2). – P. 4161–4168.

53. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity / E. Shikata, I. Ieiri, S. Ishiguro [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – P. 2630–2635.

54. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension / H. Yasuda, K. Kamide, S. Takiuchi [et al.] // *Journal of Human Hypertension*. – 2007. – Vol. 21. – P. 883–892.

55. Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke / X. Muñoz, V. Obach, B. Hurtado [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 98 (2). – P. 406–412.

56. Association of VKORC1 –1639G>A polymorphism with carotid intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus / A. Tavridou, I. Petridis, M. Vasileiadis [et al.] // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2011. – Vol. 94 (2). – P. 236–241.

57. Associations of coagulation factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations with Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis / X. Qi, W. Ren, S. De, D. Fan // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2014. – Vol. 12 (11). – P. 1801–1807.

58. Atherosclerosis and matrix metalloproteinases: experimental molecular MR imaging in vivo / V. Amirbekian, J. G. Aguinaldo, S. Amirbekian [et al.] // *Radiology*. – 2009. – Vol. 251 (2). – P. 429–438.

59. Bleeding and non-bleeding phenotypes in patients with GGCX gene mutations / M. Watzka, C. Geisen, M. Scheer [et al.] // *Thromb. Res.* – 2014. – Vol. 134. – P. 856–865.

60. Booth S. L. Determinants of vitamin K status in humans / S. L. Booth, A. A. Rajabi // *Vitamins and Hormones.* – 2008. – Vol. 78. – P. 1–22.

61. Bronsted analysis reveals Lys218 as the carboxylase active site base that deprotonates vitamin K hydroquinone to initiate vitamin K-dependent protein carboxylation / M. A. Rishavy, K. W. Hallgren, A. V. Yakubenko [et al.] // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45. – P. 13239–12248.

62. Canfield L. M. Vitamin K-dependent carboxylase: purification of the rat liver microsomal enzyme / L. M. Canfield, T. A. Sinsky, J. W. Suttie // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1980. – Vol. 202. – P. 515–524.

63. Characteristics of recombinant W501S mutated human gamma-glutamyl carboxylase / B. A. Soute, D. Y. Jin, H. M. Spronk [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol. 2. – P. 597–604.

64. Chemical modification of cysteine residues is a misleading indicator of their status as active site residues in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylation reaction / J. K. Tie, D. Y. Jin, D. R. Loiseau [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 54079–54087.

65. Chen C. ApoE Polymorphisms and the Risk of Different Subtypes of Stroke in the Chinese Population: A Comprehensive Meta-Analysis / C. Chen, Z. Hu // *Cerebrovasc. Dis.* – 2016. – Vol. 41 (3–4). – P. 119–138.

66. Cholesterol reduction and atherosclerosis inhibition by bezafibrate in low-density lipoprotein receptor knockout mice / T. Inaba, H. Yagyu, N. Itabashi [et al.] // *Hypertens. Res.* – 2008. – Vol. 31 (5). – P. 999–1005.

67. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment / H. P. Adams, B. H. Bendixen, L. J. Kappelle [et al.] // *Stroke.* – 1993. – Vol. 24. – P. 35–41.

68. Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase / S. M. Wu, W. F. Cheung, D. Frazier, D. W. Stafford // *Science*. – 1991. – Vol. 254. – P. 1634–1636.

69. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin / M. Vecsler, R. Loebstein, S. Almog [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 95. – P. 205–211.

70. Common genetic variants of MGP are associated with calcification on the arterial wall but not with calcification present in the atherosclerotic plaques / Y. Wang, J. Chen, Y. Zhang [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2013. – Vol. 6 (3). – P. 271–278.

71. Common VKORC1 variants are not associated with arterial or venous thrombosis / L. A. Hindorff, S. R. Heckbert, N. Smith [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5. – P. 2025–2027.

72. Comparison of Risk Factor between Lacunar Stroke and Large Artery Atherosclerosis Stroke: A Cross-Sectional Study in China / P. Lvi, H. Jin, Y. Liu [et al.] // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11 (3). – e0149605.

73. Contributions of Nitric Oxide Synthases, Dietary Nitrite/Nitrate, and Other Sources to the Formation of NO Signaling Products / A. B. Milsom, B. O. Fernandez, M. F. Garcia-Saura [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2012. – Vol. 17 (3). – P. 422–432.

74. Could MicroRNA polymorphisms influence warfarin dosing? A pharmacogenetics study on mir133 genes / C. Ciccacci, S. Rufini, C. Politi [et al.] // *Thromb. Res.* – 2015. – Vol. 136 (2). – P. 367–370.

75. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity / L. Bodin, C. Verstuyft, D. A. Tregouet [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – P. 135–140.

76. Davignon J. Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect / J. Davignon // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25 (2). – P. 267–269.

77. Debette S. Genetics of atherothrombotic and lacunar stroke / S. Debette, S. Seshadri // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2009. – Vol. 2 (2). – P. 191–198.

78. Decreased paraoxonase-1 activity is a risk factor for ischemic stroke in Koreans / N. S. Kim, K. Kang, M. H. Cha [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 364. – P. 157–162.

79. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis / A. Angelillo-Scherrer, P. de Frutos, C. Aparicio Cet [et al.] // *Nature Medicine.* – 2001. – Vol. 7 (2). – P. 215–221.

80. Deletion of Periostin Protects Against Atherosclerosis in Mice by Altering Inflammation and Extracellular Matrix Remodeling / J. A. Schwanekamp, A. Lorts, R. J. Vagnozzi [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2016. – Vol. 36 (1). – P. 60–68.

81. Derdeyn C. P. Mechanisms of Ischemic Stroke Secondary to Large Artery Atherosclerotic Disease / C. P. Derdeyn // *Neuroimag. Clin. N. Am.* – 2007. – Vol. 17. – P. 303–311.

82. Detailed Analysis of Gene Polymorphisms Associated with Ischemic Stroke in South Asians / S. Yadav, N. Hasan, T. Marjot [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8 (3). – e57305.

83. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed / J. Orbe, L. Fernandez, J. A. Rodríguez [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2003. – Vol. 170 (2). – P. 269–276.

84. Dong J. Dissecting stroke for anti-VWF therapeutics / J. Dong // *Blood.* – 2016. – Vol. 127 (19). – P. 2271–2272.

85. Dubovyk Ye. Analysis of the Association of T2255C Polymorphism of the Vitamin K Epoxide Reductase Gene (VKORC1) With Ischemic Atherothrombotic Stroke in Patients With its Various Risk Factors / Ye. Dubovyk, A. Potapov, V. Garbuzova // *European Journal of Medicine. Series B.* – 2014. – Vol. 1 (1). – P. 10–19.

86. Effect of CYP2C9 and VKORC1 genotypes on early-phase and steady-state warfarin dosing in Korean patients with mechanical heart valve replacement /

H. S. Kim, S. S. Lee, M. Oh [et al.] // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2009. – Vol. 19. – P. 103–112.

87. Effect of vitamin K-dependent protein precursor propeptide, vitamin K hydroquinone, and glutamate substrate binding on the structure and function of γ -glutamyl carboxylase / S. L. Higgins-Gruber, V. P. Mutucumarana, P. J. Lin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 31502–31508.

88. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose / M. J. Rieder, A. P. Reiner, B. F. Gage [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352. – P. 2285–2293.

89. Effect of VKORC1-1639G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients / M. Yoshizawa, H. Hayashi, Y. Tashiro [et al.] // *Thromb. Res.* – 2009. – Vol. 124. – P. 161–166.

90. Elevated plasma gas6 levels are associated with venous thromboembolic disease / M. D. Blostein, I. Rajotte, D. P. Rao [et al.] // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis.* – 2011. – Vol. 32 (3). – P. 272–278.

91. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton / N. L. Lee, H. Sowa, E. Hinoi [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 130 (3). – P. 456–469.

92. Endothelial NO Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke in Asian Population: A Meta-Analysis / M. Wang, X. Jiang, W. Wu, D. Zhang // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8 (3). – e60472.

93. Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxyglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system / N. Wajih, D. C. Sane, S. M. Hutson, R. Wallin // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 10540–10547.

94. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences / E. P. Soler, V. C. Ruiz // *Curr. Cardiol. Rev.* – 2010. – Vol. 6 (3). – P. 138–149.

95. Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nucleasesmediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells /

J. K. Tie, D. Y. Jin, K. Tie, D. W. Stafford // *Thromb. Haemost.* – 2013. – Vol. 11. – P. 1556–1564.

96. Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques / B. Hurtado, X. Muñoz, P. Recarte-Pelz [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2011. – Vol. 105 (5). – P. 873–882.

97. Family-based association study of matrix metalloproteinase- 3 and -9 haplotypes with susceptibility to ischemic white matter injury / M. Fornage, T. H. Mosley, C. R. Jack [et al.] // *Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 120. – P. 671–680.

98. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke / K. Jood, P. Ladenvall, A. Tjärnlund-Wolf [et al.] // *Stroke.* – 2005. – Vol. 36. – P. 2077–2281.

99. Fifty years of stroke researches in India / T. K. Banerjee, S. K. Das // *Ann. Indian Acad. Neurol.* – 2016. – Vol. 19 (1). – P. 1–8.

100. Fisher M. Brain Regulation of Thrombosis and Hemostasis: From Theory to Practice / M. Fisher // *Stroke.* – 2013. – Vol. 44 (11). – P. 3275–3285.

101. Flint A. J. Obesity and cardiovascular disease risk among the young and old is BMI the wrong benchmark / A. J. Flint, B. R. Eric // *Int. J. Epidemiol.* – 2006. – Vol. 35 (1). – P. 187–189.

102. From interactions of single transmembrane helices to folding of alpha-helical membrane proteins: Analyzing transmembrane helix-helix interactions in bacteria / D. Schneider, C. Finger, A. Prodohl [et al.] // *Curr. Protein Pept.* – 2007. – Vol. 8. – P. 45–61.

103. Functional polymorphism in gamma-glutamylcarboxylase is a risk factor for severe neonatal hemorrhage / O. M. Vanakker, K. De Coen, L. Costrop [et al.] // *J. Pediatr.* – 2011. – Vol. 159, №2. – P. 347–349.

104. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells / J.-K. Tie, D.-Y. Jin, D. L. Straight, D. W. Stafford // *Blood.* – 2011. – Vol. 117 (10). – P. 2967–2974.

105. G1691A factor V and G20210A FII mutations, acute ischemic stroke of unknown cause, and patent foramen ovale / E. Favaretto, M. Sartori, E. Conti [et al.] // *Thromb. Res.* – 2012. – Vol. 130 (5). – P. 720–724.

106. Gamma-glutamyl carboxylase and its influence on warfarin dose / C. R. King, E. Deych, P. Milligan [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 104. – P. 750–754.

107. Genetic Causes of Myocardial Infarction / J. Erdmann, P. Linsel-Nitschke, H. Schunkert // *Dtsch. Arztebl. Int.* – 2010. – Vol. 107 (40). – P. 694–699.

108. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: A potential role of CYP4F2 and GGCX polymorphisms / E. Wypasek, A. Branicka, M. Awsiuk [et al.] // *Thromb. Res.* – 2010. – Vol. 134. – P. 604–609.

109. Genetic loss of Gas6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis / E. Lutgens, M. Tjwa, P. de Frutos [et al.] // *The Journal of Pathology.* – 2008. – Vol. 216 (1). – P. 55–63.

110. Genetic variation and haplotype structure of the gene Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 in the Tamilian population / K. Kumar, D. G. Shewade, A. Surendiran, C. J. Adithan // *Pharmacol. Pharmacother.* – 2013. – Vol. 4. – P. 53–58.

111. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction / X. Dai, S. Wiernek, J. P. Evans, M. S. Runge // *World. J. Cardiol.* – 2016. – Vol. 8 (1). – P. 1–23.

112. Genetics of Coronary Artery Disease in Taiwan: A CardiometaboChip Study by the Taichi Consortium / T. Assimes, I. Lee, J. Juang [et al.] // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11 (3). – P. 472–479.

113. Genotype polymorphisms of GGCX, NQO1, and VKORC1 genes associated with risk susceptibility in patients with large-artery atherosclerotic stroke / H. Y. Shyu, C. S. Fong, Y. P. Fu [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 411 (11–12). – P. 840–845.

114. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system / C. S. Viegas, M. S. Rafael, J. L. Enriquez [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2015. – Vol. 35 (2). – P. 399–408.

115. Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications / S. B. Carla, V. S. Cavaco, P. L. Neves [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 2009. – Vol. 175 (6). – P. 2288–2298.

116. Goodstadt L. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism / L. Goodstadt, C. P. Ponting // *Trends Biochem Sci*. – 2004. – Vol. 29. – P. 289–292.

117. Growth Arrest-Specific Gene 6 (gas6) and Vascular Hemostasis / S. Laurance, C. Lemarié, M. Blostein // *Advances in Nutrition*. – 2012. – Vol. 3. – P. 196–203.

118. Guo J. Genetics of stroke / J. Guo, A. Liu, D. Su // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2010. – Vol. 31. – P. 1055–1064.

119. Hamilton D. W. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease / D. W. Hamilton // *Journal of Cell Communication and Signalling*. – 2008. – Vol. 2 (1–2). – P. 9–17.

120. Hankey G. I. Smoking and risk of stroke / G. I. Hankey // *J. Cardiovasc. Risk*. – 1999. – Vol. 6. – P. 207–211.

121. Haplotypes of VKORC1, NQO1 and GGCX, their effect on activity levels of vitamin K-dependent coagulation factors, and the risk of venous thrombosis / M. Visser, S. Roshani, J. Rutten [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2011. – 106. – P. 563–565.

122. Hatahet F. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design / F. Hatahet, D. Boyd, J. Beckwith // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2014. – Vol. 1844. – P. 1402–1414.

123. Heijne G. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues / G. Heijne // *Nature*. – 1989. – Vol. 341. – P. 456–458.

124. Hemostasis and Alterations of the Central Nervous System / J. G. Zoppo, Y. Izawa, B. T. Hawkins // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2013. – Vol. 39 (8). – P. 856–875.

125. High-resolution SNP and haplotype maps of the human gamma-glutamyl carboxylase gene (GGCX) and association study between polymorphisms in GGCX and the warfarin maintenance dose requirement of the Japanese population / P. Cha, T. Mushiroda, A. Takahashi [et al.] // *Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 52. – P. 856–864.

126. Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16 / A. Fregin, S. Rost, W. Wolz [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – P. 3229–3232.

127. Hyperhomocysteinemia, C677T MTHFR polymorphism and ischemic stroke in Tunisian patients / O. B. Salem-Berrabah, R. Mrissa, S. Machghoul [et al.] // *Tunis. Med.* – 2010. – Vol. 88 (9). – P. 655–659.

128. Idelevich A. Bone Gla protein increases HIF-1 α -dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification / A. Idelevich, Y. Rais, E. M. Ornan // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2011. – Vol. 31 (9). – P. 55–71.

129. Identification of genetic contribution to ischemic stroke by screening of single nucleotide polymorphisms in stroke patients by using a case control study design / A. Kumar, R. Sagar, P. Kumar [et al.] // *BMC Neurology*. – 2013. – Vol. 13 (136). – P. 8–16.

130. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase / T. Li, C. Y. Chang, D. Y. Jin [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 427. – P. 541–544.

131. Identification of the vitamin K-dependent carboxylase active site: Cys-99 and Cys-450 are required for both epoxidation and carboxylation / B. N. Pudota,

M. Miyagi, K. W. Hallgren [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 13033–13038.

132. Increased secretion of Gas6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques / S. Clauser, O. Meilhac, I. Bièche [et al.] // Thromb. Haemost. – 2012. – Vol. 107 (1). – P. 140–149.

133. Influence of stroke subtype on quality of care in the Get With The Guidelines–Stroke Program / E. E. Smith, L. Liang, A. Hernandez [et al.] // Neurology. – 2009. – Vol. 73 (9). – P. 709–716.

134. Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions / M. R. Planque, B. B. Bonev, J. A. Demmers [et al.] // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – P. 5341–5348.

135. IVS4-14 A/G and IVS4-73 C/T polymorphisms in OLR1 gene in patients with ischemic cerebrovascular diseases / M. T. Vietri, A. M. Molinari, M. Boggia [et al.] // Genet. Test Mol. Biomarkers. – 2010. – Vol. 14, № 1. – P. 9–11.

136. Jamil K. Clinical Implications of MTHFR Gene Polymorphism in Various Diseases / K. Jamil // Biol. Med. J. – 2014. – Vol. 6. – e107.

137. Jin D. Y. The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines / D. Y. Jin, J. K. Tie, D. W. Stafford // Biochemistry. – 2007. – Vol. 46. – P. 7279–7283.

138. Kim B. J. Ischemic Stroke Subtype Classification: An Asian Viewpoint / B. J. Kim, J. S. Kim // J. Stroke. – 2014. – Vol. 16 (1). – P. 8–17.

139. Lack of association between variants in the VKORC1 gene and cerebrovascular or coronary heart disease / R. Lemmens, S. Abboud, L. Vanhees [et al.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2008. – Vol. 6. – P. 2220–2223.

140. Lan T. H. Vascular fibrosis in atherosclerosis / T. H. Lan, X. Q. Huang, H. M. Tan // Cardiovasc. Pathol. – 2013. – Vol. 22 (5). – P. 401–407.

141. Large arterial occlusive strokes as a medical emergency: need to accurately predict clot location / P. Vanacker, M. Faouzi, A. Eskandari [et al.] // *Eur. J. Emerg. Med.* – 2016. – Vol 12 (2). – P. 1234–1241.

142. Larson A. E. Vitamin K-dependent carboxylase. Stoichiometry of carboxylation and vitamin K 2,3-epoxide formation / A. E. Larson, P. A. Friedman, J. W. Suttie // *J. Biol. Chem.* – 1981. – Vol. 256. – P. 11032–11035.

143. Lee J. J. Identification of a warfarin-sensitive protein component in a 200S rat liver microsomal fraction catalyzing vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reduction / J. J. Lee, L. M. Principe, M. J. Fasco // *Biochemistry.* – 1985. – Vol. 24. – P. 7063–7070.

144. Li Y. VKORC1 rs2359612 and rs9923231 polymorphisms correlate with high risks of cardiovascular and cerebrovascular diseases / Y. Li, J. Zhu, J. Q. Ding // *Genetics and Molecular Research.* – 2015. – Vol. 14 (4). – P. 14731–14744.

145. Litvinov D. Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases / D. Litvinov, H. Mahini, M. Garelnabi // *N. Am. J. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 4 (11). – P. 523–532.

146. Management of hypertension in stroke / J. Miller, H. Kinni, C. Lewandowski [et al.] // *Ann. Emerg. Med.* – 2014. – Vol. 64 (3). – P. 248–255.

147. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification / C. J. O'Donnell, M. K. Shea, P. A. Price [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2006. – Vol. 26 (12). – P. 2769–2774.

148. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification in men / M. D. Crosier, S. L. Booth, I. Peter [et al.] // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2009. – Vol. 55 (1). – P. 59–65.

149. Matrix metalloproteinase-3 (MMP3) and MMP9 genes and risk of myocardial infarction, ischemic stroke, and hemorrhagic stroke / R. C. Kaplan, N. L. Smith, S. Zucker [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2008. – Vol. 201. – P. 130–137.

150. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients / K. Buraczynska, J. Kurzepa, A. Ksiazek [et al.] // *Neuromolecular Med.* – 2015. – Vol. 17 (4). – P. 385–390.

151. McCann J. C. Vitamin K, an example of triage theory: is micronutrient inadequacy linked to diseases of aging? / J. C. McCann, B. N. Ames // *The American Journal of Clinical Nutrition.* – 2009. – Vol. 90 (4). – P. 889–907.

152. Meier B. M. The Fourth Pillar of the Framework Convention on Tobacco Control: Harm Reduction and the International Human Right to Health / B. M. Meier, D. Shelley // *Public Health Rep.* – 2006. – Vol. 121 (5). – P. 494–500.

153. Membrane topology for human vitamin K epoxide reductase / S. Wu, J. K. Tie, D. W. Stafford, L. G. Pedersen // *Thromb. Haemost.* – 2014. – Vol. 12. – P. 112–114.

154. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, hypertension and risk of stroke: a prospective, nested case-control study / S. Jiang, J. Li, Y. Zhang [et al.] // *Int. J. Neurosci.* – 2016. – Vol. 15. – P. 1–8.

155. miR-133a Regulates Vitamin K 2,3-Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1), a Key Protein in the Vitamin K Cycle / V. Pérez-Andreu, R. Teruel, J. Corral [et al.] // *Mol. Med.* – 2012. – Vol. 18. – P. 1466–1472.

156. Möllsten A. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system confer increased risk of stroke independently of blood pressure: a nested case-control study / A. Möllsten, B. Stegmayr, P. G. Wiklund // *J. Hypertens.* – 2008. – Vol. 26. – P. 1367–1672.

157. MTHFR deficiency induces endothelial progenitor cell senescence via uncoupling of eNOS and downregulation of SIRT1 / C. A. Lemarié, L. Shbat, C. Marchesi [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 300 (3). – P. 745–753.

158. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2 / S. Rost, A. Fregin, V. Ivaskevicius [et al.] // *Nature.* – 2004. – Vol. 427. – P. 537–541.

159. Napolitano M. Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors / M. Napolitano, G. Mariani, M. Lapecorella // *Orphanet. J. Rare. Dis.* – 2010. – Vol. 5. – P. 21–23.

160. New genetic variant that might improve warfarin dose prediction in African Americans / H. Schelleman, C. Brensinger, J. Chen [et al.] // *British Journal of Clinical Pharmacology.* – 2010. – 70 (3). – P. 393–399.

161. New insight into the association of apolipoprotein E genetic variants with carotid plaques and intima-media thickness / S. Debette, J.C. Lambert, J. Gariépy [et al.] // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37. – P. 2917–2923.

162. New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) – The catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations / B. Matagrín, A. Hodroge, A. Montagut-Romans [et al.] // *FEBS Open Biol.* – 2013. – Vol. 3. – P. 144–150.

163. No association between MGP rs1800802 polymorphism and stenosis of the coronary artery / A. Roustazadeh, M. Najafi, A. Amirfarhangi // *Ann. Saudi. Med.* – 2013. – Vol. 33 (2). – P. 149–154.

164. No clear link between VKORC1 genetic polymorphism and the risk of venous thrombosis or peripheral arterial disease / M. D. Smadja, M. A. Lorient, L. A. Hindorff [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 99. – P. 970–972.

165. No clear link between VKORC1 risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: new findings and meta-analysis / C. Verstuyft, M. Canonico, E. Bouazi [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 7. – P. 1034–1036.

166. Observation on tissue factor pathway and some other coagulation parameters during the onset of acute cerebrocardiac thrombotic diseases / M. He, Z. Wen, X. He [et al.] // *Thromb. Res.* – 2002. – 107 (5). – P. 223–228.

167. Odderson I. R. The National Institutes of Health Stroke Scale and its importance in acute stroke management / Odderson I. R. // *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* – 1999. – Vol. 10 (4). – P. 787–800.

168. Olofsson S. O. Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease / S. V. Olofsson, O. Wiklund, J. Borén // *Vasc. Health. Risk. Manag.* – 2007. – Vol. 3 (4). – P. 491–502.

169. Palta S. Overview of the coagulation system / S. Palta, R. Saroa, A. Palta // *Indian. J. Anaesth.* – 2014. – Vol. 58 (5). – P. 515–523.

170. Pan L. C. The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin Kdependent protein precursors / L. C. Pan, P. A. Price // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – Vol. 82. – P. 6109–6113.

171. Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke / B. Can Demirdöğen, A. Türkanoglu, S. Bek [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2008. – Vol. 41. – P. 1–9.

172. Partial purification of bovine liver vitamin K-dependent carboxylase by immunospecific adsorption onto antifactor X / M. Metz, C. Vermeer, B. A. Soute [et al.] // *FEBS Lett.* – 1981. – Vol. 123. – P. 215–218.

173. Patra S. K. Paraoxonase 1: a better atherosclerotic risk predictor than HDL in type 2 diabetes mellitus / S. K. Patra, K. Singh, R. Singh [et al.] // *Diabetes. Metab. Syndr.* – 2013. – Vol. 7 (2). – P. 108–111.

174. Pharmacogenetic effect of the stromelysin (MMP3) polymorphism on stroke risk in relation to antihypertensive treatment: The GenHAT Study / R. Sherva, C. E. Ford, J. H. Eckfeldt [et al.] // *Stroke.* – 2011. – Vol. 42 (2). – P. 330–335.

175. Plasma level of growth arrest-specific 6 (GAS6) protein and genetic variations in the GAS6 gene in patients with acute coronary syndrome / L. Jiang, C. Y. Liu, Q. F. Yang [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2009. – Vol. 131 (5). – P. 738–743.

176. Polymorphism of apolipoprotein E (APOE) and lipoprotein lipase (LPL) genes and ischaemic stroke in individuals of Yakut ethnicity / M. G. Parfenov,

T. Y. Nikolaeva, M. A. Sudomoina [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2007. – Vol. 255. – P. 42–49.

177. Polymorphisms in vitamin K-dependent gamma-carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population / R. Kimura, Y. Kokubo, K. Miyashita [et al.] // *Int. J. Hematol.* – 2006. – Vol. 84 (5). – P. 387–397.

178. Polymorphisms in VKORC1 and GGCX are not major genetic determinants of vitamin K-dependent coagulation factor activity in Western Germans / M. Watzka, P. Westhofen, M. Hass [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 102. – P. 418–420.

179. Polymorphisms of genes CYP2C9 and VKORC1 in patients with venous thromboembolic complications in Moscow population: effects on stability of anticoagulant therapy and frequency of hemorrhage / N. M. Vorob'eva, E. P. Panchenko, A. B. Dobrovol'skiĭ [et al.] // *Ter. Arkh.* – 2011. – Vol. 83. – P. 59–65.

180. Polymorphisms of the renin-angiotensin system are associated with blood pressure, atherosclerosis and cerebral white matter pathology / M. J. Van Rijn, M. J. Bos, A. Isaacs [et al.] // *J. Neurol. Neurosur. Ps.* – 2007. – Vol. 78. – P. 1083–1087.

181. Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification / L. J. Schurgers, H. M. Spronk, J. N. Skepper [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5 (12). – P. 2503–2511.

182. Prevalence of intracranial large artery stenosis and occlusion in patients with acute ischaemic stroke or TIA / A. Mattioni, S. Cenciarelli, G. Biessels [et al.] // *Neurol. Sci.* – 2014. – Vol. 35 (3). – P. 349–355.

183. PROC, PROCR, and PROS1 polymorphisms, plasma anticoagulant phenotypes, and risk of cardiovascular disease and mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study / A. P. Reiner, C. L. Carty, N. S. Jenny [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 6 (10). – P. 1625–1632.

184. Profactor IX propeptide and glutamate substrate binding sites on the vitamin Kdependent carboxylase identified by site-directed mutagenesis / I. Sugiura, B. Furie, C.T. Walsh [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 17837–17844.

185. Proposal of pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithm in Korean patients / J. R. Choi, J. O. Kim, D. R. Kang [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2011. – Vol. 56. – P. 290–295.

186. Protein Z deficiency in unexplained affinity to thromboses, bleedings or abortions / H. Kiesewetter, H. Radtke, A. Jainz, F. P. Schmidt // *Hamostaseologie.* – 2012. – Vol. 32 (1). – P. 95–97.

187. Protein Z gene polymorphisms, protein Z concentrations, and ischemic stroke / J. Staton, M. Sayer, G. J. Hankey [et al.] // *Stroke.* – 2005. – Vol. 36 (6). – P. 1123–1127.

188. Prothrombin G20210A and factor V Leiden polymorphisms in stroke / T. P. They-They, O. Battas, I. Slassi [et al.] // *J. Mol. Neurosci.* – 2012. – Vol. 46 (1). – P. 210–216.

189. Pseudoxanthoma elasticum and skin: clinical manifestations, histopathology, pathomechanism, perspectives of treatment / B. Marconi, I. Bobyr, A. Campanati [et al.] // *Intractable. Rare Dis. Res.* – 2015. – Vol. 4. – P. 113–122.

190. Pseudoxanthoma elasticum-like phenotype with cutis laxa and multiple coagulation factor deficiency represents a separate genetic entity / O. M Vanakker, L. Martin, D. Gheduzzi [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2007. – Vol. 127. – P. 581–587.

191. Quantum chemical study of the mechanism of action of vitamin K carboxylase (VKC). IV. Intermediates and transition states / C. H. Davis, D. D. Ii, D. F. Stafford, L. G. Pedersen // *J. Phys. Chem. A.* – 2007. – Vol. 111. – P. 7257–7261.

192. Quantum chemical study of the mechanism of action of vitamin K carboxylase in solvent / S. Wu, S. Liu, C. H. Davis [et al.] // *Int. J. Quantum. Chem.* – 2010. – Vol. 110. – P. 2744–2751.

193. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement / D. Wang, H. Chen, K. M. Momary [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112 (4). – P. 1013–1021.

194. Relation between hemostatic variables and increase of common carotid intima media thickness in patients with peripheral arterial disease / M. Cortellaro, D. Baldassarre, E. Cofrancesco [et al.] // *Stroke*. – 1996. – 27. – P. 450–454.

195. Relationship between VKORC1 single nucleotide polymorphism 1173C>T, bone mineral density & carotid intima-media thickness / D. Fodor, C. Bondor, A. Albu [et al.] // *Indian. J. Med. Res.* – 2013. – Vol. 137 (4). – P. 734–741.

196. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk / T. Bhattacharyya, S. J. Nicholls, E. J. Topol [et al.] // *JAMA*. – 2008. – Vol. 299. – P. 1265–1276.

197. Renal angiotensin-converting enzyme and blood pressure control / K. E. Bernstein, J. F. Giani, X. Z. Shen [et al.] // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2014. – Vol. 23 (2). – P. 106–112.

198. Rieder M. J. γ -Glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose / M. J. Rieder, A. P. Reiner, A. E. Rettie // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5. – P. 2227–2234.

199. Rishavy M. A. Vitamin K Oxygenation, Glutamate Carboxylation, and Processivity: Defining the Three Critical Facets of Catalysis by the Vitamin K-Dependent Carboxylase / M. A. Rishavy, K. L. Berkner // *Adv. Nutr.* – 2012. – Vol. 3. – P. 135–148.

200. Risk factors for venous and arterial thrombosis / E. Previtali, P. Bucciarelli, S. M. Passamonti, I. Martinelli // *Blood Transfus.* – 2011. – Vol. 9 (2). – P. 120–138.

201. Role of the macrophage very-low-density lipoprotein receptor in atherosclerotic lesion development / M. V. Eck, J. Oost, J. R. Goudriaan [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2005. – Vol. 183 (2). – P. 230–237.

202. Rothwell P. M. Atherothrombosis and ischaemic stroke / P. M. Rothwell // *BMJ*. – 2007. – Vol. 334 (7590). – P. 379–380.

203. Sawamura T. LOX-1 in atherosclerotic disease / T. Sawamura, I. Wakabayashi, T. Okamura // *Clin. Chim. Acta*. – 2015. – Vol. 440. – P. 157–163.

204. Schurgers L. J. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K / L. J. Schurgers, E. C. Cranenburg, C. Vermeer // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 100 (4). – P. 593–603.

205. Seishima M. Physiological Function of Apolipoproteins and Atherosclerosis / M. Seishima // *Rinsho. Byori*. – 2016. – Vol. 64 (2). – P. 186–192.

206. Sex Differences in Stroke Incidence, Prevalence, Mortality and DALYs: Results from the Global Burden of Disease Study 2013 / S. L. Barker-Collo, D. A. Bennett, R. Krishnamurthi [et al.] // *Neuroepidemiology*. – 2015. – Vol. 45 (3). – P. 203–214.

207. Shah D. V. The vitamin K dependent, in vitro production of prothrombin / D. V. Shah, J. W. Suttie // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1974. – Vol. 60. – P. 1397–402.

208. Shin B. S. Paraoxonase gene polymorphism in south-western Korean population / B. S. Shin // *J. Korean. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 24 (4). – P. 561–566.

209. Single nucleotide polymorphisms in the VKORC1 gene and the risk of stroke in the Southern German population / M.-L. Arnold, C. Lichy, I. Werner [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 100 (4). – P. 614–617.

210. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin / S. Rost, A. Fregin, M. Hunerberg [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 94. – P. 780–786.

211. Soluble epoxide hydrolase: Gene structure, expression and deletion / R. T. Harris, B. D. Hammock // *Gene*. – 2013. – Vol. 526 (2). – P. 61–74.

212. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein / G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee [et al.] // *Nature*. – 1997. – Vol. 386. – P. 78–81.

213. Stafford D. W. Vitamin K cycles and gamma-carboxylation of coagulation factors / D. W. Stafford, C. M. Hebling // *Recent. Adv. Thromb. Hemostasis*. – 2008. – Vol. 2008. – P. 27–44.

214. Stanford W. Coronary artery calcification as an indicator of preclinical coronary artery disease / W. Stanford // *Radiographics*. – 1999. – Vol. 19. – P. 1409–1419.

215. Strijdom H. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions / H. Strijdom, N. Chamane, A. Lochner // *Cardiovasc. J. Afr.* – 2009. – Vol. 20 (5). – P. 303–310.

216. Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase / W. Li, S. Schulman, R. J. Dutton [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 463. – P. 507–512.

217. Szczudlik P. Association between the -1562 C/T MMP-9 polymorphism and cerebrovascular disease in a Polish population / P. Szczudlik, A. Borratyńska // *Neurol. Neurochir. Pol.* – 2010. – Vol. 44 (4). – P. 350–357.

218. The association of protein S Tokushima-K196E with a risk of deep vein thrombosis // M. Ikejiri, H. Wada, Y. Sakamoto Y. [et al.] // *Int. J. Hematol.* – 2010. – Vol. 92. – P. 302–305.

219. The dark and bright side of atherosclerotic calcification / G. Pugliese, C. Iacobini, C. B. Fantauzzi, S. Menini // *Atherosclerosis*. – 2015. – Vol. 238. – P. 220–230.

220. The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc* / R. Yoshimoto, Y. Fujita, A. Kakino A [et al.] // *Drugs. Ther.* – 2011. – Vol. 25. – P. 379–391.

221. The effect of polymorphisms of MTHFR C677T, A1298C, MS A2756G and CBS 844ins68bp on plasma total homocysteine level and the risk of ischemic stroke in Thai children / N. Sirachainan, W. Sasanakul, A. Visudtibhan [et al.] // *Thromb. Res.* – 2008. – Vol. 122 (1). – P. 33–37.

222. The frequency of allelic polymorphism of matrix Gla-protein gene in acute coronary syndrome patients / V. Yu. Harbuzova, V. L. Hur'ianova, O. M. Parkhomenko [et al.] // *Fiziol. Zh.* – 2011. – Vol. 57 (3). – P. 16–24.

223. The G894T mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with cerebral infarction in Zhejiang Han nationality / Z. L. Zhang, D. H. Wei, R. L. Shen, Y. H. Hu // *Health Research.* – 2009. – Vol. 29. – P. 180–183.

224. The genetic interaction between VKORC1 C1173T and calumenin A29809G modulates the anticoagulant response of acenocoumarol / R. González-Conejero, J. Corral, V. Roldán [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5 (8). – P. 1701–1706.

225. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements in an adult Turkish population / N. Ozer, N. Cam, B. Tangurek [et al.] // *Heart Vessels.* – 2010. – Vol. 25. – P. 155–162.

226. The impact of genetic polymorphisms and patient characteristics on warfarin dose requirements: a cross-sectional study in Iran / S. Namazi, N. Azarpira, F. Hendijani [et al.] // *Clin. Ther.* – 2010. – Vol. 32. – P. 1050–1060.

227. The Influence of CYP2C9 and VKORC1 Gene Polymorphisms on Optimal Warfarin Doses After Heart Valve Replacement / V. Tatarūnas, V. Lesauskaitė, A. Veikutienė [et al.] // *Medicina (Kaunas).* – 2011. – Vol. 47 (1). – P. 25–30.

228. The Influence of OLR1 and PCSK9 Gene Polymorphisms on Ischemic Stroke: Evidence from a Meta-Analysis / A. Au, L. R. Griffiths, K. K. Cheng [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 15. – e18224.

229. The paraoxonase gene polymorphism in stroke patients and lipid profile / B. S. Shin, S. Y. Oh, Y. S. Kim K. W. Kim // *Acta. Neurol. Scand.* – 2008. – Vol. 117. – P. 237–243.

230. The polymorphism of matrix Gla-protein gene in ischemic atherothrombotic stroke patients / V. Yu. Harbuzova, O. I. Matlaï, Yu. O. Ataman [et al.] // *Fiziol. Zh.* – 2012. – Vol. 58 (5). – P. 14–21.

231. The putative vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase internal propeptide appears to be the propeptide binding site / P. J. Lin, D. Y. Jin, J. K. Tie [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 28584–28591.

232. The role of nitric oxide on endothelial function / D. Tousoulis, A. M. Kampoli, C. Tentolouris [et al.] // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 10 (1). – P. 4–18.

233. The Vitamin K Cycle / J. Oldenburg, M. Marinova, C. Muller-Reible, M. Watzka // *Vitamins and Hormones.* – 2008. – Vol. 78. – P. 35–62.

234. The Vitamin K Oxidoreductase Is a Multimer That Efficiently Reduces Vitamin K Epoxide to Hydroquinone to Allow Vitamin K-dependent Protein Carboxylation / M. A. Rishavy, K. W. Hallgren, L. A. Wilson [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2013. – Vol. 288 (44). – P. 31556–31566.

235. Tie J. K. Human vitamin K epoxide reductase and its bacterial homologue have different membrane topologies and reaction mechanisms / J. K. Tie, D. Y. Jin, D. W. Stafford // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 33945–33955.

236. Tsai C. I. Epidemiology of stroke and its subtypes in Chinese vs white populations / C. F. Tsai, B. Thomas, C. L. M. Sudlow // *Neurology.* – 2013. – Vol. 81 (3). – P. 264–272.

237. Two enzymes catalyze vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in mouse: VKORC1 is highly expressed in exocrine tissues while VKORC1L1 is highly expressed in brain / M. Caspers, K. J. Czogalla, K. Liphardt [et al.] // *Thrombosis Research.* – 2015. – Vol. 135. – P. 977–983.

238. Vansant G. The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element / G. Vansant, W. F. Reynolds // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 8229–8231.

239. Vasse M. The protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor complex. Systemic or local control of coagulation? / M. Vasse // *Hamostaseologie.* – 2011. – Vol. 31 (3). – P. 155–158.

240. Vitamin K Dependent Proteins and the Role of Vitamin K2 in the Modulation of Vascular Calcification: A Review / S. Margueritta, E. Asmar, J. Naoum, E. Arbid // *Oman Medical Journal.* – 2014. – Vol. 29 (3). – P. 172–177.

241. Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1) Polymorphism and Aortic Calcification / M. Teichert, L. E. Visser, R. H. N. van Schaik [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P.771–776.

242. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle / J. Oldenburg, C. G. Bevens, C. R. Muller, M. Watzka // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2006. – Vol. 8. – P. 347–353.

243. Vitamin K epoxide reductase genetic polymorphism is associated with venous thromboembolism: results from the EDITH Study / K. Lacut, C. Larramendy-Gozaló, G. L. Gal [et al.] // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis.* – 2007. – Vol. 5 (10). – P. 2020–2024.

244. Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners / S. Schulman, B. Wang, W. Li, T.A. Rapoport // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 15027–15032.

245. Vitamin K-dependent carboxylase: affinity purification from bovine liver by using a synthetic propeptide containing the gamma-carboxylation recognition site / B. R. Hubbard, M. M. Ulrich, M. Jacobs [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 6893–6897.

246. Vitamin K-dependent gamma-carbon-hydrogen bond cleavage and nonmandatory concurrent carboxylation of peptide-bound glutamic acid residues / P. A. Friedman, M. A. Shia, P. M. Gallop, A. E. Griep // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76. – P. 3126–3129.

247. VKORC1 -1639 G>A Polymorphism in Romanian Patients with Deep Vein Thrombosis / S. C. Vesa, A. P. Trifa, S. Crisan, A. D. Buzoianu // *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. – 2015. – Vol. 12. – P. 1–5.

248. VKORC1 and CD-14 genetic polymorphisms associate with susceptibility to cardiovascular and cerebrovascular diseases / J. Du, Z. Zhang, Y. Ge [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2015. – Vol. 8 (11). – P. 20444–20453.

249. VKORC1 C1173T and VKORC1 G-1639A Gene Polymorphisms in Turkish Behcet's Patients with Ocular and Non-ocular Involvement / H. D. Demir, H. Ortak, S. Sahin [et al.] // *Ophthalmic Genetics*. – 2014. – Vol. 35 (1). – P. 7–11.

250. VKORC1 Haplotypes Are Associated With Arterial Vascular Diseases (Stroke, Coronary Heart Disease, and Aortic Dissection) / Y. Wang, Z. Weili, Y. Zhang [et al.] // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113. – P. 1615–1621.

251. VKORC1 polymorphism, haplotypes and haplotype groups of warfarin dose among african-americans and european americans / N. A. Limda, T. M. Beasley, M. R. Crowley [et al.] // *Pharmacol. Genomics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 1445–1458.

252. VKORC1 rs2359612C allele is associated with increased risk of coronary artery disease in the presence of coronary calcification / Y. Wang, J. Chen, Y. Zhang [et al.] // *Human. Genetics*. – 2013. – Vol. 132. – P. 29–37.

253. Wajih N. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats / N. Wajih, D. C. Sane, S. M. Hutson // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 276–283.

254. Warfarin dosing algorithm using clinical, demographic and pharmacogenetic data from Chinese patients / J. H. You, R. S. Wong, M. M. Waye [et al.] // *J. Thromb. Thrombolysis*. – 2011. – Vol. 31. – P. 113–118.

255. Warfarin-dosing algorithm based on a population pharmacokinetic/pharmacodynamic model combined with Bayesian forecasting /

T. Sasaki, H. Tabuchi, S. Higuchi, I. Ieiri // *Pharmacogenomics*. – 2009. – Vol. 10. – P. 1257–1266.

256. Wehrmacher W. H. A brief history of scientific geriatric cardiology / W. H. Wehrmacher, A. Ahmed // *Compr. Ther.* – 2008. – Vol. 34 (2). – P. 100–104.

257. World Health Organization report on the global tobacco epidemic: raising taxes on tobacco. – Geneva: WHO, 2015. – 197 P.

258. Wu S. H. Worldwide socioeconomic status and stroke mortality: an ecological study / S. H. Wu, J. Woo, X.-H. Zhang // *Int. J. Equity. Health*. – 2013. – Vol. 12. – P. 42–44.

259. Wu S. M. Identification and purification to near homogeneity of the vitamin K-dependent carboxylase / S. M. Wu, D. P. Morris, D. W. Stafford // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 1991. – Vol. 88. – P. 2236–2240.

260. Zhang L. Effect of SNP polymorphisms of EDN1, EDNRA, and EDNRB gene on ischemic stroke / L. Zhang, R. Sui // *Cell. Biochem. Biophys*. – 2014. – Vol. 70 (1). – P. 233–239.